



# Métodos Analíticos para a Detecção e Quantificação de Ácido Hialurónico: Revisão da Literatura e Conceção de um Protocolo de Aplicação Prática

Inês da Cunha Rego



ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE

## **Métodos Analíticos para a Detecção e Quantificação de Ácido Hialurónico: Revisão da Literatura e Conceção de um Protocolo de Aplicação Prática**

**Autor**

Inês da Cunha Rego

**Orientadores**

Professora Doutora Patrícia Correia / Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto;

LAQV-REQUIMTE, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

Professora Doutora Luisa Barreiros / Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto;

LAQV-REQUIMTE, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Área de Especialização em  
Tecnologias do Medicamento e de Produtos de Saúde pela Escola  
Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



## Agradecimentos

A entrega deste trabalho representa, para mim, muito mais do que a conclusão de mais uma etapa académica, simboliza a persistência, a dedicação e a concretização de um sonho, conseguido mesmo em momentos de desafio e cansaço.

À minha mãe, não existem palavras suficientes para agradecer todo o amor, carinho e força que sempre me deste. Mãe, sempre foste e sempre serás um símbolo de força e inspiração para mim. Obrigada por me ensinares que desistir nunca é opção, que mesmo nos momentos mais difíceis basta erguer a cabeça e seguir em frente. Obrigada por cada abraço, cada palavra de coragem e cada gesto que me ajudou mesmo quando achei que não conseguia. Este trabalho não é apenas meu, também é teu. É o reflexo de tudo o que me deste e me ensinaste, e conseguimos isto juntas

Aos meus avós, o meu eterno obrigada por acreditarem em sempre em mim, por cuidarem da vossa menina com tanto carinho e por me mostrarem que apoio genuíno transforma sonhos em realidade.

Ao meu Diogo, o meu porto seguro, obrigada por nunca me deixares desistir, mesmo nos dias mais difíceis. Obrigada por seres o meu ombro, a minha força silenciosa e por me recordares que sou capaz disto e muito mais. Obrigada por estares presente sempre que precisei, nos dias de choro, de cansaço, e de desânimo, mas também nos dias de alegria e de pequenas vitórias. O que verdadeiramente importa é que te tenho ao meu lado, sem ti, nada seria igual. Obrigada por me acompanhares em cada passo desta jornada e por acreditares em mim quando mais duvidava.

À minha Pati, amiga, confidente e conselheira, obrigada por todo o apoio incondicional nesta jornada. Obrigada por acreditares em mim nos momentos de dúvida e por me dares coragem quando mais precisava. Obrigada por estares sempre perto madrinha, agora a tua afilhada está prestes a tornar-se mestre!

Aos meus girassóis, obrigada pela paciência e compreensão nos momentos mais complicados, por confiarem em mim e acompanharem o meu percurso com carinho.

Aos meus birrentos, não tenho palavras que definam todo o apoio que me deram nesta jornada. Obrigada por cada troca para conseguir estar presente nas aulas, obrigada por cada voto de confiança e obrigada por acreditarem sempre nas capacidades da mais nova.

E, por fim, um especial agradecimento às minhas orientadoras, Professoras Doutoradas Patrícia Correia e Luísa Barreiros, que me guiaram e apoiaram no desenvolvimento deste trabalho, garantindo que seguia sempre o caminho certo.

Agora chegou a hora de voar mais um pouco. Obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este sonho se concretizasse.



## Resumo

O ácido hialurónico (AH) é um polissacarídeo de elevada relevância na indústria farmacêutica e cosmética, amplamente utilizado em formulações terapêuticas e de cuidados de saúde. A necessidade de métodos analíticos robustos e sustentáveis para a quantificação de AH constitui um desafio, dada a complexidade das matrizes. Este trabalho teve como objetivo a elaboração de um protocolo para a deteção e quantificação de AH, apoiado na identificação, compilação e avaliação das metodologias descritas na literatura, considerando o desempenho analítico e a sustentabilidade, pela aplicação da métrica *Analytical GREENness Metric Approach and Software*. A análise comparativa permitiu identificar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com deteção ultravioleta como a técnica com o melhor desempenho, aliando sensibilidade e precisão a sustentabilidade. Com base nesta avaliação, foi elaborado um protocolo para a quantificação de AH, definindo-se como condições experimentais a utilização de uma coluna de exclusão por tamanho, caudal de fase móvel de 1 mL/min, deteção a 198 nm e tempo de corrida de 10 minutos. A implementação do protocolo revela-se viável, embora dependa da aquisição de recursos adicionais. Como perspetivas futuras, destaca-se a validação experimental e a sua aplicação a diferentes matrizes, potenciando a sua utilidade na investigação e no controlo de qualidade.

**Palavras-chave:** Ácido hialurónico; HPLC-UV; Desempenho analítico; Sustentabilidade; Protocolo laboratorial



## Abstract

Hyaluronic acid (HA) is a polysaccharide of high relevance in the pharmaceutical and cosmetic industries, widely used in formulations with therapeutic and healthcare purposes. The need for robust and sustainable analytical methods for the quantification of HA constitutes a challenge, given the complexity of the matrices involved. This work aimed to develop a protocol for the detection and quantification of HA, supported by the identification, compilation, and evaluation of methodologies described in the literature, considering both analytical performance and sustainability through the application of the *Analytical GREENness Metric Approach and Software*. The comparative analysis highlighted High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection as the technique with best analytical performance, combining sensitivity and precision with sustainability. Based on the results, a protocol for HA quantification was developed, establishing as experimental conditions the use of a size exclusion column, a mobile phase flow rate of 1 mL/min, detection at 198 nm and a 10 minute-run time. The implementation of the protocol is feasible, although it depends on the acquisition of additional resources. As future perspective, experimental validation and its application to different matrices are highlighted, enhancing its usefulness in research and quality control.

**Keywords:** Hyaluronic acid; HPLC-UV; Analytical performance; Sustainability; Laboratory protocol



## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Estrutura e composição do Ácido Hialurónico.....	1
1.2. Funções biológicas do Ácido Hialurónico .....	1
1.3. Diferentes pesos moleculares do Ácido Hialurónico e suas funções.....	2
1.3.1. Ácido Hialurónico de alto peso molecular.....	2
1.3.2. Ácido Hialurónico de médio peso molecular.....	2
1.3.3. Ácido Hialurónico de baixo peso molecular.....	2
1.3.4. Ácido Hialurónico de muito baixo peso molecular.....	2
1.4. Alterações nos níveis de Ácido Hialurónico com o envelhecimento .....	3
1.5. Estratégias para manutenção dos níveis de Ácido Hialurónico .....	3
1.6. Aplicações do Ácido Hialurónico na indústria cosmética e em suplementos.....	3
1.7. Propriedades clínicas do Ácido Hialurónico.....	4
1.7.1. Mecanismos de viscosuplementação e intervenções oculares.....	4
1.7.2. Aplicações terapêuticas do Ácido Hialurónico em diferentes vias de administração.....	4
1.8. Relevância dos métodos analíticos na avaliação do Ácido Hialurónico.....	5
1.9. Química Verde.....	5
1.10. Objetivos do estudo.....	7
2. Métodos.....	8
2.1. Revisão da literatura .....	8
2.1.1. Planeamento e seleção dos estudos.....	8
2.1.2. Recolha de dados e organização da informação.....	8
2.2. Avaliação da sustentabilidade (" <i>greenness</i> ") dos métodos analíticos.....	9
2.3. Conceção do Protocolo Prático.....	9
2.3.1. Seleção e definição do método analítico.....	9
2.3.2. Desenvolvimento do protocolo.....	9
2.4. Avaliação de viabilidade da implementação do protocolo prático.....	9
3. Resultados e Discussão.....	10
3.1. Análise da literatura.....	10
3.2. Avaliação da sustentabilidade (" <i>greenness</i> ") dos métodos analíticos.....	26
3.2.1. Avaliação da aplicação da métrica AGREE aos métodos analíticos descritos no Artigo 1.....	26



3.2.2.	Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 2 .....	28
3.2.3.	Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 3 .....	29
3.2.4.	Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 4 .....	30
3.2.5.	Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 5 .....	31
3.2.6.	Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 6 .....	32
3.2.7.	Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 7 .....	33
3.3.	Análise comparativa da revisão da literatura e da avaliação da sustentabilidade .....	34
3.3.1.	Método carbazol .....	34
3.3.2.	Eletroforese capilar .....	35
3.3.3.	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem .....	35
3.3.4.	Cromatografia líquida acoplada a outros sistemas de deteção .....	36
3.4.	Elaboração do procedimento .....	37
3.5.	Implementação do protocolo .....	38
4.	Conclusão .....	40
	Referências Bibliográficas .....	41
	Anexos .....	46



## Lista de Siglas e Abreviaturas

AH – Ácido Hialurónico

AGREE – *Analytical GREENness Metric Approach and Software*

BAGI – *Blue Applicability Grade Index*

CISA – Centro de Investigação em Saúde e Ambiente

CZE – *Capilar Zone Electrophoresis* (Eletroforese capilar)

ESI – Ionização por *electrospray*

GAC – *Green Analytical Chemistry* (Química Analítica Verde)

GAPI – *Green Analytical Procedure Index*

HAF – *Hyaluronic Acid Fragments* (Fragmentos de ácido hialurónico)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

LAQV- REQUIMTE – Laboratório Associado para a Química Verde

LC-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem

LOD – Limit of detection (Limite de Detecção)

LOQ – Limit of quantification (Limite de Quantificação)

MALDI-TOF – Espectrometria de massa com desorção/ionização assistida por laser e tempo de voo

MCM – Método do carbazol

RGB – *Red, Green, Blue Additive Color Model*

SEC – *Size Exclusion Column* (Coluna de Exclusão por tamanho)

UV – Ultravioleta



## 1. Introdução

O ácido hialurónico (AH) é uma molécula essencial na biologia dos vertebrados, amplamente reconhecido pelas suas propriedades de retenção de água e funções estruturais dos tecidos (Necas et al., 2008). Sendo um glicosaminoglicanos, desempenha um papel importante na manutenção da saúde articular, na cicatrização de feridas e na hidratação da pele (Chen & Abatangelo, 1999). Devido à sua versatilidade e segurança, tornou-se um ingrediente popular nos produtos cosméticos e na medicina estética (Fallacara et al., 2018) pelo que o seu estudo, incluindo a sua caracterização e quantificação, se revela de elevada importância.

### 1.1. Estrutura e composição do Ácido Hialurónico

O AH é um polímero natural não ramificado, pertencente ao grupo de heteropolissacarídeos denominados de glicosaminoglicanos, amplamente distribuído nos tecidos nervosos, conjuntivos e epiteliais dos vertebrados (Fallacara et al., 2018). A sua estrutura é composta por unidades repetidas de dissacarídeos de ácido D-glucorónico e N-acetilglucosamina, ligadas em alternância por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-4) e  $\beta$ -(1-3) (Salwowska et al., 2016). Na sua forma nativa, apresenta uma cadeia longa e um elevado peso molecular (Litwiniuk et al., 2016). A Figura 1 representa a estrutura química do AH, ilustrando as unidades de dissacarídeos e as ligações glicosídicas que promovem a sua interligação.

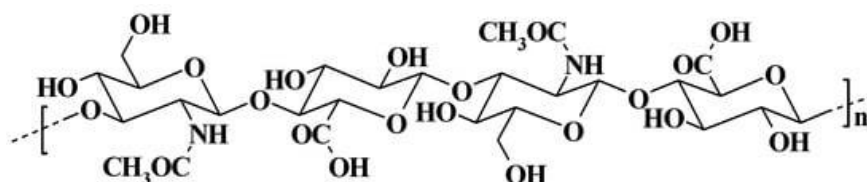


Figura 1: Estrutura química do AH (Valachová et al., 2024)

### 1.2. Funções biológicas do Ácido Hialurónico

O AH desempenha várias funções biológicas, incluindo a manutenção da elasticidade e viscosidade dos tecidos conjuntivos líquidos, como o líquido vítreo ocular e o sinovial articular, além de regular o transporte de água e a hidratação dos tecidos (Marinho et al., 2021). Também atua na retenção de água e lubrificação das articulações e músculos (Necas et al., 2008). Além disso, desempenha um papel essencial na organização dos proteoglicanos da matriz celular, conferindo estrutura e suporte aos tecidos, e participa em processos mediados por recetores, como mitose, migração, metástase, crescimento tumoral e inflamação (Marinho et al., 2021).



### **1.3. Diferentes pesos moleculares do Ácido Hialurónico e suas funções**

O AH apresenta diferentes pesos moleculares, desempenhando cada um deles funções específicas e oferecendo benefícios distintos.

#### **1.3.1. Ácido Hialurónico de alto peso molecular**

O AH de alto peso molecular (acima de 1000 kDa) gera uma rede densa, adesiva e viscosa. Atua principalmente na superfície dos tecidos, criando uma camada protetora e hidratante crucial para a formação de uma barreira que previne a desidratação e protege contra agentes externos (Fallacara et al., 2018). É amplamente utilizado na viscosuplementação para o tratamento da osteoartrite, onde proporciona lubrificação e amortecimento das articulações (Bagga et al., 2006).

#### **1.3.2. Ácido Hialurónico de médio peso molecular**

O AH de médio peso molecular (entre 300 e 1000 kDa) apresenta menor viscosidade que o AH de alto peso molecular (Girish & Kemparaju, 2007). Facilita a hidratação e a elasticidade dos tecidos, sendo absorvido pelas camadas mais externas, o que melhora a sua função estrutural (Kawada et al., 2014). É utilizado em formulações farmacêuticas promovendo o aumento da absorção de medicamentos e, em oftalmologia, como lubrificação ocular, sendo um componente comum de alguns colírios (Tamer, 2013).

#### **1.3.3. Ácido Hialurónico de baixo peso molecular**

O AH de baixo peso molecular (entre 50 e 300 kDa) possui elevada capacidade de penetração tecidual, atingindo camadas mais profundas dos tecidos. Favorece a regeneração celular e a reparação tecidual, desempenhando um papel fundamental na cicatrização de feridas e na regeneração de tecidos (Stern et al., 2006). Está presente em terapias regenerativas e produtos destinados à recuperação de lesões e cicatrização acelerada (Chen & Abatangelo, 1999).

#### **1.3.4. Ácido Hialurónico de muito baixo peso molecular**

Por fim, o AH de muito baixo peso molecular (abaixo de 50 kDa) tem baixa viscosidade e alta permeabilidade (Necas et al., 2008). É capaz de alcançar profundamente a matriz extracelular para estimular a produção de colagénio e elastina. Além disso, pode apresentar propriedades imunomoduladoras, influenciando a resposta inflamatória (Chen & Abatangelo, 1999). Estudos indicam que o AH de peso molecular extremamente baixo pode atuar como modulador de respostas inflamatórias



crônicas e doenças autoimunes, interagindo com células do sistema imunitário, como macrófagos e células dendríticas, regulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Jiang et al., 2011).

#### **1.4. Alterações nos níveis de Ácido Hialurónico com o envelhecimento**

Os níveis de AH no organismo não são constantes ao longo dos anos, sendo influenciados por diversos fatores. À medida que a idade aumenta, a produção natural de AH diminui devido à redução da atividade das células responsáveis pela sua produção, bem como alterações no metabolismo (Papakonstantinou et al., 2012). Essa diminuição pode ter diversas consequências negativas para a saúde de cada indivíduo e para a aparência da sua pele. Na pele, níveis reduzidos de AH equivalem a menos hidratação e elasticidade, contribuindo para o aparecimento de rugas e perda de firmeza. Nas articulações, a redução dos níveis de AH pode acelerar o desgaste das articulações e aumentar o risco de desenvolvimento de osteoartrite (Papakonstantinou et al., 2012; Tamer, 2013).

#### **1.5. Estratégias para manutenção dos níveis de Ácido Hialurónico**

Devido ao papel fundamental do AH na saúde dos tecidos, é essencial adotar estratégias que ajudam a manter os níveis adequados ao longo do tempo. Isso pode incluir uma dieta equilibrada, um estilo de vida saudável ou, em alguns casos, utilização de cosméticos, suplementos ou intervenções médicas específicas (Shaharudin & Aziz, 2016). Entre essas estratégias, destaca-se a suplementação oral com AH, que, segundo alguns estudos, demonstrou ser eficaz no aumento dos níveis séricos de AH, proporcionando melhorias na hidratação da pele e no alívio do desconforto articular em populações mais idosas (Shaharudin & Aziz, 2016).

#### **1.6. Aplicações do Ácido Hialurónico na indústria cosmética e em suplementos**

Os produtos cosméticos que incluem AH nas suas formulações tornaram-se comuns devido aos efeitos benéficos na saúde da pele. Além disso, o AH também é frequentemente encontrado em suplementos alimentares, promovendo a saúde articular e cutânea (Hsu et al., 2021). No caso da suplementação para a saúde articular, o AH tem demonstrado potencial para reduzir a dor e a rigidez nas articulações, especialmente em indivíduos com osteoartrite. Vários suplementos combinam AH com outras substâncias, como o colagénio, vitaminas e minerais, potenciando os seus efeitos na saúde da pele e das articulações (Oliviero et al., 2020).



## 1.7. Propriedades clínicas do Ácido Hialurónico

Devido a certas propriedades do AH, como a sua natureza viscosa, a sua biocompatibilidade e a não-imunogenicidade, este é utilizado em diversas aplicações clínicas. Entre essas aplicações, destaca-se o seu uso para reforçar o fluido articular em casos de artrite, como agente auxiliar em cirurgias oculares, e como cicatrizante ou regenerador de feridas pós-cirúrgicas (Medina et al., 2006).

Além disso, estudos demonstram que o AH pode atuar como agente de distribuição de fármacos em diferentes vias de administração, incluindo nasal, parentérica, pulmonar, tópica e oftálmica (Brown & Jones, 2005). A sua capacidade de formar géis viscosos tornou-o uma escolha frequente para formulações de libertação controlada, nas quais a libertação lenta do fármaco melhora a eficácia terapêutica, tornando-se particularmente vantajosa em tratamentos prolongados (Brown & Jones, 2005).

### 1.7.1. Mecanismos de viscosuplementação e intervenções oculares

O AH é utilizado no reforço do fluido articular, principalmente através de injeções intra-articulares, procedimento conhecido como viscosuplementação, comumente aplicado em casos de osteoartrite (Colen et al., 2012). Este tratamento melhora a viscosidade e a lubrificação sinovial, reduzindo o atrito entre os ossos e funciona como amortecedor em casos de choques. Além disso, pode diminuir a inflamação e estimular a produção natural do AH pelo corpo (Moreland, 2003).

Nas cirurgias oculares, como às cataratas, transplante de córnea e no descolamento da retina, o AH é utilizado como viscoelástico para proteger estruturas delicadas proporcionando um ambiente estável e hidratado (Higashide & Sugiyama, 2008). Além disso, o AH é aplicado em feridas pós-cirúrgicas como cicatrizante e regenerador, devido às suas propriedades hidratantes e capacidade de promover a regeneração dos tecidos, acelerando a cicatrização e melhorando a qualidade da pele regenerada (Chen & Abatangelo, 1999).

### 1.7.2. Aplicações terapêuticas do Ácido Hialurónico em diferentes vias de administração

O AH funciona como agente de distribuição de fármacos em várias vias de administração, incluindo nasal, parentérica, pulmonar, tópica e oftálmica, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e retenção de água (Brown & Jones, 2005). Na administração nasal, ele aumenta a absorção dos medicamentos através da mucosa nasal (Illum, 2000). Na via parentérica, forma sistemas de libertação controlada, protegendo os fármacos da degradação. Para a via pulmonar, ajuda na dispersão e penetração dos medicamentos nos pulmões. Na aplicação tópica, melhora a penetração dos princípios ativos na pele



(Brown & Jones, 2005). Na via oftálmica, aumenta a retenção dos medicamentos na superfície ocular, proporcionando hidratação e proteção (Zhang et al., 2021). Essas propriedades do AH contribuem para aumentar a eficácia, estabilidade e promover a libertação controlada dos fármacos (Huang & Huang, 2018). Devido a essas propriedades, o AH destaca-se como um veículo de grande interesse em terapêuticas avançadas, como o transporte de fármacos anticancerígenos e terapêuticas genéticas. A sua capacidade de penetrar facilmente nos tecidos-alvo de forma eficiente e controlada representa um avanço significativo na melhoria das abordagens terapêuticas, potenciando os efeitos do tratamento e reduzindo os efeitos colaterais indesejados (Huang & Huang, 2018).

### **1.8. Relevância dos métodos analíticos na avaliação do Ácido Hialurónico**

Com o crescente interesse no AH e a sua crescente inclusão numa vasta variedade de produtos cosméticos e terapêuticos, é fundamental estabelecer métodos analíticos eficazes para a sua deteção e quantificação em diferentes matrizes. A qualidade dos produtos que contém AH é de extrema importância, uma vez que afeta não só a eficácia do produto, mas também a segurança do consumidor. Isso implica que os métodos analíticos devem permitir monitorizar a estabilidade do AH ao longo do tempo e sob diferentes condições, avaliando se os níveis declarados no rótulo correspondem à quantidade efetiva presente no produto.

Além disso, a caracterização precisa do AH é importante para a validação das propriedades funcionais e para garantir que o produto atende aos padrões regulamentares de qualidade. Os métodos analíticos bem estabelecidos permitem a deteção e quantificação do AH, mas também a identificação de possíveis contaminantes e a avaliação da pureza do polímero, aspetos essenciais em ambientes industriais.

### **1.9. Química Verde**

A Química Verde tem como objetivo tornar os processos químicos mais sustentáveis, promovendo práticas que visam reduzir o impacto ambiental através de princípios como a utilização de solventes menos tóxicos, a minimização das quantidades de reagentes e energia, e o incentivo da utilização de matérias-primas renováveis (Sajid & Plotka-Wasyłka, 2022).

Na Química Analítica, embora o consumo de reagentes e solventes seja em menor escala, os resíduos gerados tendem a ser mais dispersos e difíceis de controlar, o que exige a implementação de estratégias eficazes para a sua minimização. Em 2013, foram estabelecidos os doze princípios da Química Analítica Verde ou *Green Analytical Chemistry* (GAC), os quais propõem abordagens mais sustentáveis para cada etapa do processo analítico (Gałuszka et al., 2013). Estes princípios servem de base para a conceção,



avaliação e melhoria de procedimentos analíticos, promovendo práticas mais seguras, eficientes e ambientalmente responsáveis.

Os doze princípios da GAC são:

1. Métodos analíticos diretos devem ser usados para evitar o tratamento da amostra;
2. O tamanho da amostra e o número de amostras devem ser minimizados;
3. As medições devem ser realizadas in situ (no local);
4. A integração dos processos e operações analíticas economiza energia e reduz o uso de reagentes;
5. Técnicas automatizadas e de escala reduzida devem ser preferencialmente escolhidas;
6. A derivatização deve ser evitada;
7. A produção de grandes quantidades de resíduos deve ser minimizada, e a eliminação de resíduos deve ser garantida;
8. Métodos multianalito ou multiparâmetro são preferíveis em relação aos métodos que determinam apenas um analito de cada vez;
9. O uso de energia deve ser minimizado;
10. Reagentes obtidos de fontes renováveis são preferíveis;
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do operador deve ser aumentada.

Com o objetivo de avaliar o grau de sustentabilidade dos métodos analíticos, têm sido desenvolvidas métricas específicas, que permitem comparar diferentes metodologias, identificar alternativas mais ecológicas e, ainda, reduzir os impactos ambientais associados (Tobiszewski et al., 2015). Essas ferramentas são essenciais para orientar o desenvolvimento de métodos analíticos mais verdes e alinhados com os princípios da sustentabilidade.

Uma das métricas desenvolvidas para avaliar a sustentabilidade de métodos analíticos é a ferramenta AGREE (*Analytical GREENness Metric Approach and Software*), proposta em 2020 (Pena-Pereira et al., 2020). Esta ferramenta tem como finalidade a avaliação do procedimento analítico do ponto de vista da GAC, considerando os seus 12 princípios. Cada princípio recebe uma pontuação entre 0 (menos sustentável) e 1 (mais sustentável). O resultado é representado por um pictograma em forma de relógio, onde os 12 segmentos ao redor simbolizam os princípios da GAC. A cor de cada segmento varia do verde-escuro (valor próximo de 1) ao vermelho (valor próximo de 0), indicando visualmente o desempenho de cada princípio. No centro do pictograma, apresenta-se a pontuação final e a cor correspondente,



facilitando a interpretação geral do método. A principal vantagem da métrica AGREE é a sua abrangência, pois considera todos os princípios da GAC e todas as etapas envolvidas num método analítico. Além disso, o formato visual combinado com a pontuação numérica torna a análise mais intuitiva, permitindo comparar métodos de forma mais rápida e eficaz (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2022). Na Figura 2, encontra-se um pictograma exemplo, juntamente com a escala de cor associada à pontuação e o significado de cada critério.

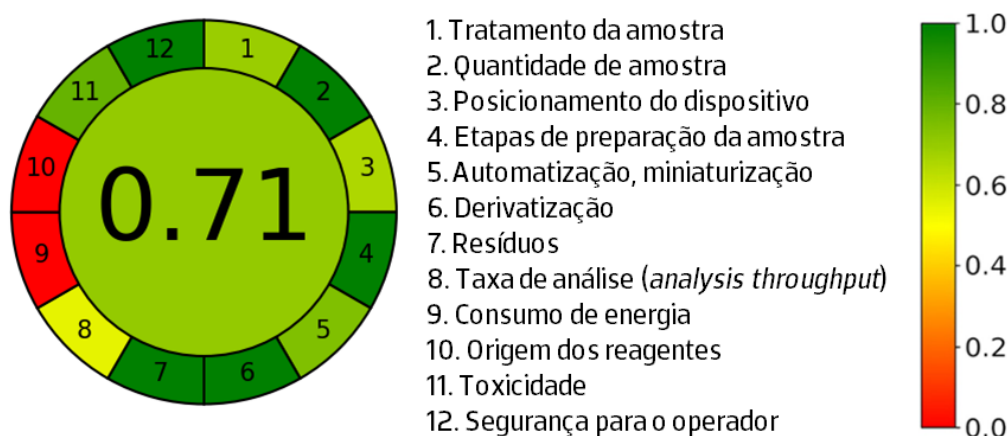


Figura 2: Pictograma exemplo da métrica AGREE com escala de pontuação

### 1.10. Objetivos do estudo

A realização deste estudo teve como objetivo principal a conceção de um método analítico para a deteção e quantificação do AH, tendo em conta os instrumentos e recursos disponíveis no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), pertencente ao Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV-REQUIMTE). Para tal, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Identificar as técnicas analíticas de deteção e quantificação do AH encontradas na literatura;
- Caracterizar os diferentes tipos de matrizes analisadas, bem como os procedimentos de extração e preparação da amostra descritos nos estudos publicados;
- Compilar a informação relativa aos reagentes e consumíveis necessários para a execução dos métodos analíticos identificados;
- Avaliar a sustentabilidade de cada método através da aplicação de métricas específicas;
- Selecionar o método com o melhor desempenho, considerando simultaneamente parâmetros analíticos e indicadores de sustentabilidade;
- Elaborar um procedimento experimental baseado no método selecionado para deteção e quantificação de AH;
- Verificar a viabilidade de implementação do procedimento no CISA, incluindo a estimativa dos custos associados.



## 2. Métodos

Este trabalho foi desenvolvido em quatro etapas fundamentais: a revisão da literatura com a caracterização e avaliação dos parâmetros analíticos das várias técnicas encontradas, a avaliação da sustentabilidade (*“greenness”*), a conceção de um protocolo analítico para a deteção e quantificação do ácido hialurónico, e a avaliação de viabilidade para aplicação no CISA.

### 2.1. Revisão da literatura

A revisão da literatura foi realizada com o objetivo de identificar e compilar informações relativas às técnicas analíticas disponíveis para a deteção e quantificação de AH, incluindo os seus requisitos, procedimentos de preparação da amostra e desempenho.

#### 2.1.1. Planeamento e seleção dos estudos

O planeamento e seleção dos estudos foram realizados mediante pesquisa na base de dados científica *Pubmed*, recorrendo a estratégias baseadas em palavras-chave e as suas combinações, tais como *“Hyaluronic acid quantification methods”*, *“Analytical techniques for hyaluronic acid”* e *“Sample preparation for hyaluronic acid detection”*. Foram aplicados critérios de inclusão rigorosos, privilegiando artigos que descrevessem metodologias de forma detalhada e que estivessem redigidos em inglês ou português. Não foi aplicada qualquer restrição temporal, tendo sido incluídos todos os artigos publicado até à atualidade. Estudos incompletos, sem descrição clara dos métodos aplicados ou que não se alinhassem com os objetivos do presente estudo foram excluídos da análise.

#### 2.1.2. Recolha de dados e organização da informação

Após seleção, os dados foram recolhidos dos diferentes estudos considerando os princípios analíticos das técnicas descritas (como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrofotometria e espectrometria de massa), as matrizes analisadas, bem como os procedimentos de extração e preparação das amostras. Foram ainda compiladas informações relacionadas com os reagentes, consumíveis e parâmetros/condições experimentais empregues em cada método. Tais dados foram organizados e submetidos a análise crítica, que permitiu a comparação dos métodos com base em indicadores de desempenho analítico, como sensibilidade, especificidade, custo-benefício e complexidade técnica.



## 2.2. Avaliação da sustentabilidade (“greenness”) dos métodos analíticos

A avaliação da sustentabilidade dos métodos foi realizada com base na métrica AGREE, através da sua versão disponível online. Os dados foram inseridos manualmente, fundamentados nas informações recolhidas durante a revisão da literatura, contemplando os doze princípios da Química Analítica Verde.

## 2.3. Conceção do Protocolo Prático

Com base nas informações obtidas na revisão da literatura e na avaliação da sustentabilidade dos métodos, procedeu-se à elaboração de um protocolo analítico detalhado, passível de aplicação em diferentes contextos laboratoriais.

### 2.3.1. Seleção e definição do método analítico

Nesta fase, procedeu-se à seleção da técnica que melhor atendia aos critérios de sensibilidade e especificidade, bem como aquela que obteve melhor classificação segundo a métrica AGREE. Foram igualmente estabelecidos os procedimentos padrão para a preparação das amostras, bem como as condições analíticas específicas a serem adotadas.

### 2.3.2. Desenvolvimento do protocolo

O protocolo foi estruturado em detalhe, contemplando todas as etapas necessárias à sua implementação. Foram identificados os reagentes, consumíveis e equipamentos essenciais, assim como selecionadas as condições experimentais, como temperatura, tempo de análise e seleção adequada de solventes. Adicionalmente, foram descritos os procedimentos de extração e/ou purificação aplicáveis às matrizes de interesse, garantindo a clareza e replicabilidade das etapas em diferentes laboratórios.

## 2.4. Avaliação de viabilidade da implementação do protocolo prático

Posteriormente à conceção do protocolo analítico, procedeu-se a uma avaliação crítica da sua viabilidade no contexto do CISA, tendo em consideração a compatibilidade entre os requisitos metodológicos e os recursos laboratoriais disponíveis. A análise contemplou tanto equipamentos como os reagentes e consumíveis necessários, permitindo verificar a sua disponibilidade e identificar eventuais lacunas.

Para os materiais não disponíveis no centro de investigação, realizou-se uma avaliação dos custos recorrendo a fornecedores de referência, como VWR Avantor<sup>®</sup>, Frilabo e Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Esta avaliação permitiu aferir a viabilidade económica do protocolo, identificando potenciais constrangimentos logísticos e financeiros.



### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Análise da literatura

No seguimento da pesquisa bibliográfica, procedeu-se à consulta nas bases de dados previamente definidas, recorrendo a combinações de palavras-chave específicas, tal como descrito na secção de Métodos. Esta pesquisa permitiu identificar um total de 54 publicações. Contudo, após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, apenas sete artigos foram considerados elegíveis para análise crítica. Destes, cinco artigos abordam metodologias aplicadas a formulações farmacêuticas semissólidas, um artigo incide em formulações oftálmicas e, por fim, um artigo refere a análise de suplementos alimentares. A Tabela 1 apresenta uma breve compilação dos dados extraídos das análises críticas. Em seguida, é apresentada a análise detalhada de cada um dos sete estudos selecionados.

*Tabela 1: Breve compilação de informações recolhidas da revisão da literatura*

Artigo 1	Artigo 2	Artigo 3	Artigo 4	Artigo 5	Artigo 6	Artigo 7
<p><b>Técnica Analítica:</b> HPLC, CZE e MCM e espectrofotometria direta</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Formulações semissólidas (géis, cremes e pomadas)</p>	<p><b>Técnica Analítica:</b> HPLC-UV com SEC</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Formulações oftálmicas</p>	<p><b>Técnica Analítica:</b> HPLC-UV com SEC</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Formulações farmacêuticas (microemulsões)</p>	<p><b>Técnica Analítica:</b> HPLC com deteção por fluorescência</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Formulações semissólidas (loções hidratantes)</p>	<p><b>Técnica Analítica:</b> LC-ESI-MS/MS</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Formulações semissólidas (pomadas e géis)</p>	<p><b>Técnica Analítica:</b> HPLC com deteção por fluorescência</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Suplementos alimentares</p>	<p><b>Técnica Analítica:</b> HPLC com SEC e deteção por índice de refração</p> <p><b>Matriz analisada:</b> Cultura celular, sérum e cápsulas</p>



O artigo *“New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE”* (Artigo 1) (Alkrad et al., 2002) avaliou e comparou diversos métodos analíticos para a quantificação de AH em formulações farmacêuticas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CZE) direta e indireta, método colorimétrico com carbazol (MCM) e espectrofotometria direta. O método HPLC, após digestão enzimática, revelou excelente reprodutibilidade, apresentando os valores de limite de detecção mais reduzidos. A técnica CZE direta demonstrou desempenho superior na análise de AH com recurso a um capilar com célula de bolha, evidenciando boa seletividade e reduzida interferência da matriz. Por outro lado, os métodos espectrofotométricos evidenciaram baixa precisão e elevada variabilidade (Alkrad et al., 2002).

Conclui-se a partir da revisão da literatura que, neste estudo, nem todos os métodos investigados foram aplicados diretamente em formulações farmacêuticas. A maioria das metodologias foi inicialmente testada em AH de padrões de referência, com peso molecular conhecido, permitindo apenas a validação do método. Apenas três abordagens, HPLC sem digestão enzimática, MCM e CZE, foram efetivamente aplicadas à quantificação de AH em formulações farmacêuticas semissólidas, demonstrando a sua aplicabilidade em matrizes complexas e reforçando a relevância prática destas técnicas para a determinação do analito em contextos reais de produção.

A Tabela 2 sintetiza os principais parâmetros de comparação das técnicas. De forma geral, os métodos HPLC e CZE direta destacaram-se como as abordagens mais fiáveis e robustas para a análise de formulações farmacêuticas complexas, evidenciando equilíbrio entre sensibilidade, seletividade e aplicabilidade prática.



Tabela 2: Comparação dos métodos analíticos para quantificação de Ácido Hialurónico em formulações farmacêuticas, adaptado de Alkrad et al. (2002)

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Padrão AH 1200 kDa  Formulações farmacêuticas semissólidas (géis, cremes e pomadas)	Ácido sulfúrico, Hidróxido de sódio (NaOH), metanol, água ultrapura	Dissolver em ácido sulfúrico, ajuste de pH, filtração e injeção no sistema. Fase móvel: água/metanol (96:4)	Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção UV	Cromatógrafo HPLC LC-10 AD acoplado a detetor UV SPD-10A (Shimadzu)	UV a 280 nm	-Coluna Nucleosil-100 C18 (4 mm ID, 5 µm) -Coluna Lichrospher 100 RP-8 (4 mm ID, 5 µm)	<b>Faixa linear:</b> 5–1500 µg/mL (r=0,9998); <b>LOD:</b> 1 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 5,98 µg/mL	<b>Vantagens:</b> Boa linearidade, precisão e sensibilidade e método robusto. <b>Limitações:</b> Necessidade de reagentes agressivos e risco de degradação da matriz.
Padrão AH 31 kDa	Enzimas para digestão, ácido sulfúrico, acetonitrilo, água ultrapura	Digestão enzimática, filtração e injeção no sistema. Fase móvel: água/acetonitrilo (96:4)			UV a 195 nm		<b>Faixa linear:</b> 10–100 µg/mL (r=0,9998); <b>LOD:</b> 0,3 ng/mL; <b>Desvio padrão:</b> 0,58 µg/mL.	<b>Vantagens:</b> Alta seletividade e sensibilidade e menor interferência de matriz. <b>Limitações:</b> Enzimas caras e tempo de preparação mais longo.
Formulações farmacêuticas semissólidas (géis, cremes e pomadas)	Ácido sulfúrico, carbazol, NaOH, água destilada	Digestão com ácido sulfúrico, adição de carbazol, aquecimento e medição da cor	Espectrofotometria com reação colorimétrica com carbazol	Espectrofotómetro UV-120-02 (Shimadzu)	UV-Vis (530 nm aprox., reação carbazol)	Cuvette de quartzo para leitura em UV-Vis	<b>Faixa linear:</b> 10–350 µg/mL (r=0,9972); <b>LOD:</b> 10 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 36 µg/mL.	<b>Vantagens:</b> Método simples, barato e fácil de aplicar. <b>Limitações:</b> Baixa precisão e reprodutibilidade e interferência da cor.
Padrão AH 1200 kDa	Água destilada	Adição direta da amostra ao espectrofotómetro sem digestão	Espectrofotometria direta em UV	Espectrofotómetro UV-120-02 (Shimadzu)	UV a 280 nm	Cuvette de quartzo para leitura em UV-Vis	<b>Faixa linear:</b> 5–1500 µg/mL (r=0,9972); <b>LOD:</b> 5 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 7 µg/mL.	<b>Vantagens:</b> Método rápido e direto, sem necessidade de digestão. <b>Limitações:</b> Elevada variabilidade; menor seletividade.



Tabela 1: Comparação dos métodos analíticos para quantificação de Ácido Hialurónico em formulações farmacêuticas, adaptado de Alkrad et al. (2002) (Continuação)

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Padrão AH 1200 kDa	Tampão fosfato 40 mM (pH 7,7), água ultrapura	Preparação da amostra em tampão fosfato 40 mM, filtração, injeção.	Eletroforese capilar com deteção direta por UV	Sistema de eletroforese capilar Hewlett-Packard G1600A	UV a 194 nm	Capilar de sílica fundida padrão	<b>Faixa linear:</b> 30–500 µg/mL (r=0,998); <b>LOD:</b> 30 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 4,55 µg/mL	<b>Vantagens:</b> Análise direta de AH e não requer digestão. <b>Limitações:</b> LOD mais elevado (30 µg/mL) e menor sensibilidade.
Padrão AH 1200 kDa  Formulações farmacêuticas semissólidas (géis, cremes e pomadas)					UV a 194 nm	Capilar de sílica com célula de bolha (150 µm)	<b>Faixa linear:</b> 12,5–500 µg/mL (r=0,988); <b>LOD:</b> 5 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 2,33 µg/mL	<b>Vantagens:</b> Maior sensibilidade e menor LOD comparado ao capilar padrão. <b>Limitações:</b> Requer capilar especial com célula de bolha.
Padrão AH 31kDa	Enzimas para digestão, tampão fosfato 40 mM (pH 7,7), água ultrapura	Digestão enzimática, preparação da amostra em tampão fosfato 40 mM, filtração, injeção.			UV a 194 nm	Capilar de sílica com célula de bolha (150 µm)	<b>Faixa linear:</b> 10–500 µg/mL (r=0,9994); <b>LOD:</b> 10 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 5,42 µg/mL	<b>Vantagens:</b> Combina boa sensibilidade com boa seletividade por digestão enzimática. <b>Limitações:</b> Exige digestão prévia, aumentando o tempo total.
Padrão AH 1200 kDa	Ácido ascórbico, tampão fosfato 40 mM, água ultrapura	Preparação da amostra com ácido ascórbico e tampão fosfato, filtração, injeção.			Eletroforese capilar com deteção indireta por UV	UV a 250 nm	Capilar de sílica com célula de bolha (150 µm)	<b>Faixa linear:</b> 25–500 µg/mL (r=0,9033); <b>LOD:</b> 30 µg/mL; <b>Desvio padrão:</b> 14,41 µg/mL



Relativamente ao Artigo 2, intitulado *“Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV”* (Ruckmani et al., 2013), foi desenvolvido e validado um método de cromatografia líquida de alta eficiência com deteção ultravioleta (UV), utilizando uma coluna de exclusão por tamanho (SEC), destinado à quantificação de AH em formulações oftálmicas. Este método revelou-se altamente específico e sensível, apresentando um desempenho analítico robusto, caracterizado por elevada precisão, reprodutibilidade e linearidade ao longo do intervalo de concentrações analisadas (1–38 g/mL). A deteção foi realizada na zona do UV a 205 nm, recorrendo a uma fase móvel de tampão fosfato, garantindo a estabilidade do AH e minimizando interferências provenientes da matriz da formulação (Ruckmani et al., 2013). Adicionalmente, o processo de preparação da amostra era bastante simples, envolvendo apenas a diluição da amostra e filtração antes da injeção no sistema de cromatografia.

O método demonstrou também elevada robustez face a pequenas variações operacionais, o que reforça a sua aplicabilidade tanto em ensaios de controlo de qualidade, como em estudos de estabilidade de formulações farmacêuticas. Além disso, a coluna SEC permite, além da quantificação do AH, uma caracterização simultânea da distribuição de pesos moleculares de AH, acrescentando valor à análise em formulações complexas. A Tabela 3 apresenta uma síntese dos principais parâmetros extraídos do artigo, incluindo informação detalhada sobre a metodologia, reagentes, condições instrumentais e o desempenho do método.



Tabela 3: Métodos analítico para quantificação de Ácido Hialurónico em formulações oftálmicas, adaptado de Ruckmani et al. (2013)

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Soluções oftálmicas (2 mg/mL de AH)	AH padrão de referência (Farmacopeia Britânica), tampão fosfato monopotássico, hidróxido de potássio (10%), água Milli-Q, excipientes (fosfato de sódio, NaCl), membrana filtrante 0,45 µm	Diluição em fase móvel, filtração (0,45 µm) e injeção direta.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de exclusão por tamanho (SEC) com deteção UV	Sistema LC2010AHT (Shimadzu) com injetor automático, coluna aquecida e detetor UV-vis	Deteção UV a 205 nm	Coluna BioSep SEC S2000 (300 × 7,8 mm), software LC Solution 1.22 SP1	<b>Faixa linear:</b> 0,32-0,48 mg/mL <b>Desvio padrão relativo:</b> < 2% <b>Recuperação média:</b> 99,30%	<b>Vantagens:</b> Método simples, rápido, específico, reprodutível, robusto e validado segundo ICH. <b>Limitações:</b> Necessidade de coluna SEC específica; possível interferência com picos próximos ao volume morto em condições menos otimizadas.



O método desenvolvido por Çağlar et al. (2022), “*Development and validation of an HPLC method for the determination of hyaluronic acid active substance in pharmaceutical formulation*” (Artigo 3), baseia-se em HPLC-UV, com coluna de exclusão por tamanho (SEC), com o objetivo de quantificar AH em formulações farmacêuticas, nomeadamente em microemulsões. Este protocolo evita etapas de derivatização, simplificando a execução experimental e contribuindo para a redução do tempo de análise e dos custos adicionais.

A validação do método foi realizada segundo as diretrizes do ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), considerando os principais parâmetros de desempenho analítico. O método evidenciou elevada especificidade, sem interferência dos excipientes presentes na microemulsão testada, demonstrou linearidade excelente (coeficiente de correlação superior a 0,999), exatidão e precisão adequadas, com baixos valores de desvio padrão e capacidade para detetar AH em concentrações na gama de  $\mu\text{g}$  por mL baixa. Adicionalmente, revelou-se robusto, mantendo consistência perante pequenas variações nas condições cromatográficas (Çağlar et al., 2022).

Além da fiabilidade analítica, o método destaca-se pela simplicidade operacional e pela ausência de etapas complexas de preparação de amostra, permitindo a sua aplicação em rotinas laboratoriais. A Tabela 4 sintetiza os principais parâmetros metodológicos e analíticos do método proposto no estudo.



Tabela 4: Método analítico para quantificação de Ácido Hialurónico em microemulsões, adaptado de Çağlar et al., 2022

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Microemulsão	Ácido Hialurónico, Sulfato de sódio, Azida de sódio, Cloreto de sódio, IPM (isopropil miristato), Tween 80, etanol, água ultrapura, filtro de membrana.	-Preparação de soluções padrão de AH em NaCl 0,9%, diluições em fase móvel, filtração e injeção no HPLC. -Dissolução das microemulsões em fase móvel, filtração e injeção no HPLC.	Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção UV	Sistema HPLC Agilent 1100 com detetor UV	UV a 198 nm	Coluna analítica OHPak Shodex SB-806M HQ (13 µm, 8,0 x 300 mm), coluna de proteção OHPak SB-G (8 µm, 6,0 x 50 mm).	<b>Faixa linear:</b> 5–100 µg/mL; <b>LOD:</b> 0,266 µg/mL; <b>LOQ:</b> 0,805 µg/mL; Estável por até 48 h	<b>Vantagens:</b> Método simples, preciso, específico e reprodutível, com alta linearidade e recuperação próxima de 100%. <b>Limitações:</b> O método pode não ser adequado para matrizes mais complexas sem etapas adicionais de preparação.



No estudo de Shimekake et al. (2023), intitulado “*Analysis of acetylated hyaluronic acid in moisturizing lotion and milk lotion by HPLC with fluorescence detection*” (Artigo 4), foi desenvolvido um método destinado à quantificação de formas modificadas de AH, nomeadamente AH acetilado, em loções hidratantes. O método baseia-se em HPLC com derivatização pós-coluna e deteção por fluorescência, caracterizado pela elevada sensibilidade e seletividade, obtidas através da formação de compostos fluorescentes resultantes da reação entre 2-cianoacetamida e os grupos aldeído produzidos pela hidrólise alcalina do ácido hialurónico acetilado (Shimekake et al., 2023). A metodologia foi desenvolvida para tentar ultrapassar os desafios associados à complexidade das matrizes cosméticas, incluindo etapas de purificação, concentração e extração que permitem a remoção eficiente de interferentes. O método demonstrou excelente desempenho analítico, evidenciado pela elevada sensibilidade e especificidade, com limites de deteção e quantificação de 60 e 200 ng, respetivamente. Contudo a taxa de recuperação mostrou-se dependente da matriz, registando valores mais baixos em loções de elevada viscosidade, evidenciando limitações na aplicação em determinadas formulações farmacêuticas (Shimekake et al., 2023).

Os detalhes completos da preparação da amostra e do protocolo encontram-se sintetizados na Tabela 5, que resume os reagentes, equipamentos, condições experimentais e os principais parâmetros do método.



Tabela 5: Método analítico para quantificação de Ácido Hialurónico acetilado em loções hidratantes, adaptado de Shimekake et al., 2023

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de detecção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Loções hidratantes	Ácido hialurónico acetilado, padrões de AH, Acetona, Cloreto de sódio (0,2 M e 16%), Metanol, 2-cianoacetamida (0,5%), Hidróxido de sódio (1 M), Metanol, tampão fosfato (50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 3,5), D <sub>2</sub> O, filtro de seringa (0,45 µm).	Extração da loção com acetona, seguida de centrifugação. O sobrenadante obtido sofreu purificação numa coluna de troca iónica (SAX), com posterior lavagem e eluição com NaCl. O extrato foi liofilizado, ressuspenso em metanol e filtrado.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência	Bomba de HPLC (5110), Forno de coluna (L-7300), Injetor Automático (L-2200), Bomba de embolo duplo para reagentes fluorogénicos (NP-KX-210), Banho de reação seco (DB-5) e Detetor de fluorescência (FP-1520)	Derivatização com 2-cianoacetamida sob NaOH a 110 °C → emissão de fluorescência (Excitação: 346 nm / Emissão: 410 nm)	Coluna HPLC Inertsil C4 (150 × 4.6 mm), Spin columns (Vivapure Q mini H, SAX), software Chromato-PRO para análise	<b>Faixa Linear:</b> 12,5 a 400 µg/mL (R <sup>2</sup> = 0,997) <b>LOD:</b> 60 ng <b>LOQ:</b> 200 ng	<b>Vantagens:</b> Alta sensibilidade e seletividade com fluorescência e detecção direta de AH acetilado. <b>Limitações:</b> Baixa recuperação de amostras reais (16,9%), reação pós-coluna complexa e uso de reagentes tóxicos (NaOH e 2-cianoacetamida).



O estudo de Kühn et al. (2003), "*Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC/ESI/MS*" (Artigo 5), descreve a aplicação da técnica de cromatografia líquida acoplada à deteção por espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS/MS) para a quantificação de fragmentos de ácido hialurónico (HAF) resultantes de digestão enzimática em formulações semissólidas, mais especificamente, géis e pomadas. A degradação enzimática gera misturas complexas de oligómeros, cuja distribuição de massa molecular foi caracterizada por espectrometria de massa com desorção/ionização assistida por laser e tempo de voo (MALDI-TOF).

A análise por LC-MS/MS em modo de ionização por *electrospray* (ESI) negativo permitiu a deteção seletiva de fragmentos característicos de AH ( $m/z$  554 e 466), sendo as intensidades quantificadas com recurso a um padrão interno (maltose), o que assegurou precisão e robustez e permitiu corrigir potenciais efeitos de matriz. A resposta analítica demonstrou elevada sensibilidade às condições instrumentais, nomeadamente à posição do capilar de sílica fundida no interface ESI, exigindo calibração rigorosa e utilização do padrão interno para garantir fiabilidade (Kühn et al., 2003).

A recuperação dos analitos apresentou variabilidade dependente da matriz analisada. O gel de carboximetilcelulose obteve taxas de recuperação mais elevadas, possivelmente associadas à evaporação de água durante a preparação, enquanto a emulsão apresentou recuperações mais baixas e maior variabilidade, relacionada com interações entre os fragmentos de AH e componentes da formulação, como os surfactantes (Kühn et al., 2003).

Os equipamentos utilizados, os reagentes envolvidos na preparação das amostras, as condições instrumentais e os principais parâmetros analíticos de validação estão resumidos na Tabela 6, proporcionando uma visão consolidada da abordagem experimental e do desempenho do método.



Tabela 6: Método analítico para quantificação de fragmentos de Ácido Hialurónico em formulações farmacêuticas (pomadas e géis), adaptado de Kühn et al. (2003)

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Formulações farmacêuticas (pomadas e géis)	Metanol, Água, tetrahydrofurano (2,5% m/v em metanol), D-Maltose, Carboximetilcelulose, Soluções padrão de HAF (HAF4, HAF5, HAF6), enzima hialuronato liase, tampão acetato de sódio (0,01 M, pH 7).	Dissolução do gel e pomada em solução de padrão interno (metanol/água + maltose) Homogeneização Extração líquido-líquido e injeção de 15 µL da amostra no sistema LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> em modo negativo e em tandem (LC-ESI-MS/MS)	Bomba HPLC SpectraSystem P4000, mostrador automático (AS 3000), Desgaseificador de membrana, Espectrómetro de massa Finnigan LCQ (ThermoFinnigan, USA) com interface de ESI	Deteção por MS/MS (modo ESI negativo) com fragmentação de iões específicos (ex: $m/z$ 378 → fragmentos em $m/z$ 554, 466, 437, com diferentes cargas) Quantificação relativa ao padrão interno ( $m/z$ 683 da maltose)	Capilar de sílica fundida posicionado exatamente no final da agulha ESI Fonte ESI com voltagem de 4,5 kV Coluna Nucleosil C2 (250 mm × 2 mm, 100-7, Macherey-Nagel)	<b>Faixas de linearidade:</b> – HAF6: 5–50 µg/mL – HAF4 e HAF5: 20–80 µg/mL <b>Curvas de calibração:</b> – $m/z$ 554: linear – $m/z$ 466: polinomial de segunda ordem	<b>Vantagens:</b> Alta especificidade e seletividade, permite quantificação em matrizes complexas e deteção simultânea de múltiplos elementos. <b>Limitações:</b> Forte dependência das condições do ESI (ex.: posição do capilar) e sem padrões calibradores puros para todos os fragmentos (uso de razão de picos).



No estudo intitulado “*Quantification of hyaluronic acid and methylsulfonylmethane in dietary supplements*” (Artigo 6) (Harmita et al., 2020), foi desenvolvido e validado um método analítico destinado à determinação de AH e metilsulfonilmetano (MSM) em suplementos alimentares.

A quantificação do AH foi realizada por HPLC com deteção por fluorescência, sendo previamente necessária a derivatização da amostra com cloreto de fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC-Cl), um agente derivatizante reconhecido pela elevada seletividade para grupos amino e pela capacidade de gerar compostos altamente fluorescentes, favorecendo a deteção sensível do analito (Harmita et al., 2020).

O método desenvolvido para a quantificação de AH em suplementos alimentares demonstrou elevado desempenho analítico, evidenciado por um coeficiente de correlação de 0,9983 na faixa de linearidade de 5– 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , refletindo excelente linearidade. O método apresentou limites de deteção (LOD = 3,55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e quantificação (LOQ = 11,84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na gama baixa de  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Adicionalmente os ensaios de avaliação da exatidão e precisão revelaram valores de recuperação entre 98,59 e 100,42 % e coeficiente de variação inferior a 2%, evidenciando a fiabilidade e reprodutibilidade da metodologia para a análise de AH em matrizes complexas como os suplementos alimentares (Harmita et al., 2020).

Face a estas características, o método demonstrou ser uma ferramenta robusta e adequada para aplicação em controlos de qualidade de suplementos alimentares que contenham AH. Os principais parâmetros de validação analítica, bem com as condições experimentais, encontram-se resumidas na Tabela 7.



Tabela 7: Método analítico para quantificação de Ácido Hialurónico em suplementos alimentares, adaptado de Harmita et al. (2020)

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Suplementos alimentares (em pó/cápsulas)	Padrões de AH, Ácido clorídrico (HCl), Tampão borato (pH 9,3), Cloreto de fluorenilmetiloxycarboxil (FMOC-Cl), Acetonitrilo, Solução de acetato pH 4,2, Água ultrapura e Filtros de membrana 0,45 µm.	<b>Solução padrão AH:</b> 200 mg de padrão de AH dissolvido em 100 mL de HCl 0,1 N. <b>Amostra:</b> Dissolução em 100 mL de HCl 0,1 N. <b>Solução para análise:</b> 300 µL de solução padrão de AH ou amostra + 300 µL de tampão borato + 300 µL de solução FMOC-Cl, agitar no vortex durante 20 s, deixar repousar 2 min. Filtrar e injetar 20 µL da mistura no HPLC.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção por fluorescência	Sistema de HPLC Shimadzu® Detetor de fluorescência	Fluorescência com derivatização prévia com FMOC-Cl (excitação 255 nm / emissão 330 nm)	Coluna Shimadzu® C18, Injetores manuais, Vortex, Vials para HPLC e Seringas para HPLC	<b>Linearidade:</b> 5–50 µg/mL (r= 0,9983); <b>LOD:</b> 3,55 µg/mL; <b>LOQ:</b> 11,84 µg/mL; <b>Precisão (%CV):</b> 0,10–0,79%; <b>Exatidão (% recuperação):</b> 98,59–100,42%.	<b>Vantagens:</b> Alta sensibilidade, excelente precisão e exatidão, boa seletividade com derivatização e método simples para suplementos em pó/cápsulas <b>Limitações:</b> Necessidade de etapa de derivatização (tempo adicional), deteção apenas do derivado fluorescente, requer FMOC-Cl (sensível à luz e humidade) e não aplicável diretamente a matrizes biológicas



No estudo de Suárez-Hernández et al. (2021), intitulado "*Validation of an analytical method for the simultaneous determination of hyaluronic acid concentration and molecular weight by size-exclusion chromatography*" (Artigo 7), foi desenvolvido e validado um método analítico baseado em cromatografia líquida de exclusão por tamanho (HPLC-SEC) para a quantificação do AH e determinação simultânea do seu peso molecular em diferentes matrizes. O método recorre a um detetor de índice de refração, que permite a análise direta das frações moleculares de AH sem necessidade de derivatização, preservando a integridade do polímero.

O método demonstrou elevado desempenho em amostras complexas, incluindo produtos cosméticos e amostras biológicas, permitindo diferenciar frações moleculares e caracterizar a composição e qualidade do polímero, informação essencial para avaliar a sua funcionalidade em aplicações farmacêuticas (Suárez-Hernández et al., 2021). As curvas analíticas foram desenvolvidas para concentração e peso molecular nas faixas de 100-1000 mg/L e 0,011-2,200 MDa, respetivamente, evidenciando ampla linearidade. O método apresentou repetibilidade e reprodutibilidade superiores a 98%, bem como limites de deteção e quantificação de 12 e 42 mg/L, respetivamente, confirmando a sua fiabilidade.

A Tabela 8 sintetiza os principais parâmetros do método, incluindo reagentes e consumíveis, técnica instrumental empregue, preparação da amostra e figuras de mérito. Esses dados reforçam a robustez e a aplicabilidade da técnica, que contribui tanto para a pesquisa como para o controlo de qualidade de produtos que incluem AH. O facto de permitir simultaneamente a quantificação a determinação do peso molecular do AH tornam este método mais abrangente, vantajoso e eficiente que os restantes métodos apresentados.



Tabela 8: Método analítico para quantificação de Ácido Hialurónico em matrizes diferentes, adaptado de Suárez-Hernández et al. (2021)

Tipo de matriz	Reagentes e consumíveis	Preparação da amostra	Técnica instrumental	Equipamentos	Método de deteção	Acessórios utilizados	Figuras de mérito	Vantagens e limitações
Cultura celular, sérum e cápsulas	AH (diferentes pesos moleculares), lauril sulfato de sódio (SDS), Nitrato de sódio, Água ultrapura (Milli-Q) e Filtros de membrana 0,45 µm	<b>Cultura celular:</b> 1 mL de amostra + 1 mL de SDS, vortex, reação (10 min à temperatura ambiente), remoção de bactérias por centrifugação, filtração e injeção de 80 µL. <b>Cápsulas e sérum:</b> Dissolução em água ultrapura, filtração e injeção de 80 µL.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de exclusão por tamanho (SEC)	Sistema HPLC Alliance e2695 Detetor de índice de refração (Refractive Index 2414) Software Empower 3	Deteção por índice de refração	Coluna Ultrahydrogel 2000 (7,8 × 300 mm)	<b>Método validado com repetibilidade de 98,3%, coeficiente de variação entre 0,8 e 1,7% e reprodutibilidade superior a 98%.</b>	<b>Vantagens:</b> Permite quantificação simultânea e determinação do peso molecular do AH, aplicável em diferentes matrizes (biológicas e produtos farmacêuticos) <b>Limitações:</b> Necessidade de detetor de índice de refração (menos sensível que UV) pode haver interferência em amostras mais complexas.



### 3.2. Avaliação da sustentabilidade (“greenness”) dos métodos analíticos

A aplicação da métrica AGREE (*Analytical GREENness Metric Approach and Software*) constituiu uma etapa essencial para a avaliação da sustentabilidade dos métodos analíticos identificados na revisão da literatura, permitindo quantificar o grau de conformidade com os doze princípios da Química Analítica Verde. Esta métrica fornece uma representação visual e numérica de cada método, possibilitando a comparação objetiva da sustentabilidade entre diferentes abordagens analíticas. Para a sua aplicação, os dados de cada método relacionados com cada um dos 12 princípios da Química Analítica Verde foram extraídos dos artigos selecionados e inseridos na ferramenta *online* da métrica AGREE. Para garantir a uniformidade dos resultados obtidos a partir dos diferentes artigos analisados, foram estabelecidos critérios que foram aplicados em todas as análises, de modo a garantir a coerência e a precisão dos resultados, permitindo uma comparação mais rigorosa entre os diferentes métodos estudados. Por exemplo, considerou-se que um número de etapas igual ou inferior a 4 correspondia a um número reduzido de passos no processo analítico e que, quando o volume gasto não excedia 2 mL, a preparação da amostra podia ser considerada miniaturizada.

#### 3.2.1. Avaliação da aplicação da métrica AGREE aos métodos analíticos descritos no Artigo 1

No Artigo 1, foram realizadas três avaliações utilizando a métrica AGREE. Embora o estudo apresentasse um número superior de métodos, foram considerados apenas aqueles cuja matriz analisada correspondia a produtos farmacêuticos, ou seja, amostras, uma vez que os demais analisaram exclusivamente padrões de AH.

A análise da técnica MCM por meio da métrica AGREE resultou num valor (*score*) de 0,39, conforme ilustrado na Figura 3. Este resultado evidencia que o método apresenta um baixo nível de sustentabilidade, não podendo ser considerado “verde”. Além disso, a metodologia envolve a utilização de reagentes tóxicos como o ácido sulfúrico (critério 11), e recorre a compostos que não são de origem renovável (critério 10), além de gerar um volume significativo de resíduos (critério 7), fatores que justificam a predominância da cor vermelha em alguns critérios no pictograma. E, por último, a segurança do operador revelou-se comprometida (critério 12), dado que os reagentes utilizados apresentam propriedades tóxicas, persistentes, bioacumulativas, inflamáveis e corrosivas, configurando riscos ocupacionais relevantes. De qualquer modo, o método apresenta algumas características em que está mais alinhado com os princípios da Química Verde, tais como um número reduzido de passos de



preparação da amostra (critério 4), a necessidade de uma quantidade reduzida de amostra (critério 2) e o consumo controlado de energia (critério 9).

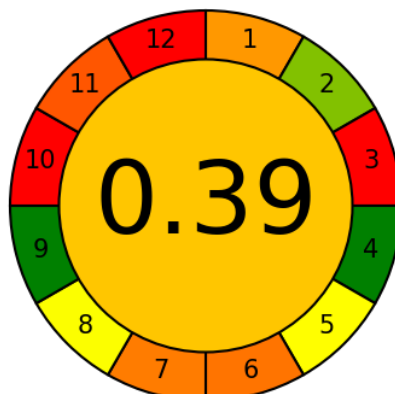


Figura 3: Pictograma AGREE da técnica MCM (valor=0,39) (Alkrad et al., 2002)

A análise do método HPLC, realizada com a métrica AGREE, resultou num valor global (*score*) de 0,44, refletido por uma coloração amarela/laranja no pictograma apresentado na Figura 4. Este resultado indica um nível intermédio de sustentabilidade, evidenciando que, embora o método seja eficaz do ponto de vista analítico, apresenta limitações significativas em termos ambientais. A técnica exige um volume inicial de amostra relativamente elevado, cerca de 5 mL (critério 2), utiliza reagentes que não são de origem renovável (critério 10) e gera uma quantidade considerável de resíduos (critério 7), fatores que contribuem para a cor laranja predominante no pictograma. No que concerne à segurança do operador (critério 12), a avaliação também se posiciona em nível intermédio, refletindo o uso de reagentes inflamáveis, oxidantes e tóxicos (critério 11), o que representa riscos ocupacionais relevantes. Dos parâmetros avaliados, três deles apresentam uma pontuação mais alta e, por conseguinte, uma coloração verde, uma vez que o método envolve poucos passos de preparação da amostra (critério 4), não envolve derivatização (critério 6) e não consome muita energia (critério 9).

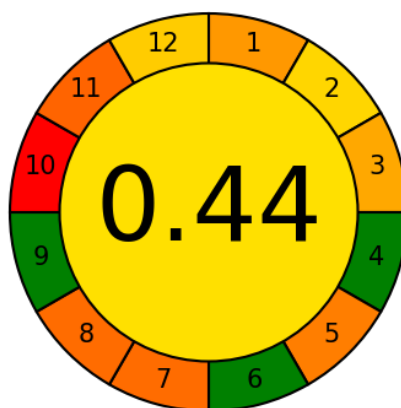


Figura 4: Pictograma AGREE da técnica HPLC-UV (valor=0,44) (Alkrad et al., 2002)



A avaliação do método CZE, efetuada através da métrica AGREE, revelou um valor global (*score*) de 0,5, indicando um nível intermédio de sustentabilidade, e o mais alto dos métodos descritos no artigo, conforme ilustrado no pictograma apresentado na Figura 5. O método caracteriza-se pela utilização de um volume inicial de amostra relativamente reduzido, aproximadamente 1 mL (critério 2), e pela geração de uma quantidade considerável de resíduos (critério 7). Embora apresente desempenho analítico adequado, a técnica apresenta limitações em termos de produtividade, permitindo a realização de apenas duas análises por hora (critério 8). Adicionalmente, os reagentes utilizados não são provenientes de fontes renováveis (critério 10). No que se refere à segurança do operador, a avaliação indica um nível intermédio, evidenciado pela coloração alaranjada no pictograma (critério 12). Entre os parâmetros avaliados, alguns apresentam a coloração verde, refletindo a conformidade do método com critérios de sustentabilidade. Além do volume reduzido de amostra (critério 2), o método envolve um número baixo de etapas de preparação da amostra (critério 4), trata-se de um procedimento semi-automático e miniaturizado (critério 5), não requer derivatização (critério 6) e apresenta um baixo consumo energético (critério 9).

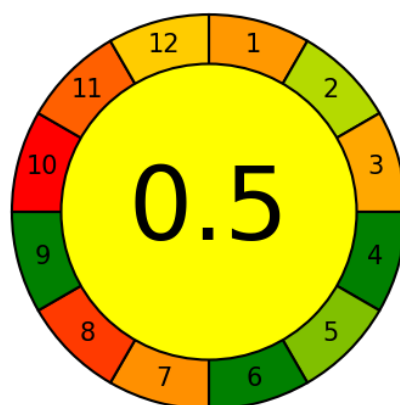


Figura 5: Pictograma AGREE da técnica CZE (valor=0,5) (Alkrad et al., 2002)

### 3.2.2. Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 2

No Artigo 2, a avaliação do método HPLC realizada através da métrica AGREE, resultou num valor global (*score*) de 0,56, conforme ilustrado na Figura 6. O pictograma evidencia uma coloração amarela-esverdeada/verde-claro, indicando um nível intermédio de sustentabilidade, considerado moderadamente favorável. Esta técnica requer um valor inicial de amostra relativamente elevado, aproximadamente 5 mL (critério 2), e produz uma quantidade moderada de resíduos (critério 7). Os reagentes utilizados não são provenientes de fontes renováveis (critério 10), representando uma limitação do ponto de vista da sustentabilidade ambiental. No que se refere à segurança do operador, o pictograma apresenta uma coloração verde-claro, refletindo um desempenho global positivo, embora os



reagentes empregues possuam propriedades corrosivas e irritantes (critério 12). Apesar de ser necessário recorrer a um reagente tóxico para ajuste do pH, este encontra-se em quantidades reduzidas e dissocia-se completamente no final do procedimento, minimizando o risco associado (critério 11). Entre os parâmetros do método que apresentam pontuação mais alta, e por conseguinte coloração mais verde, destacam-se ainda o reduzido número de etapas de preparação da amostra (critério 4), a não utilização de derivatização (critério 6) e o consumo de pouca energia (critério 9).

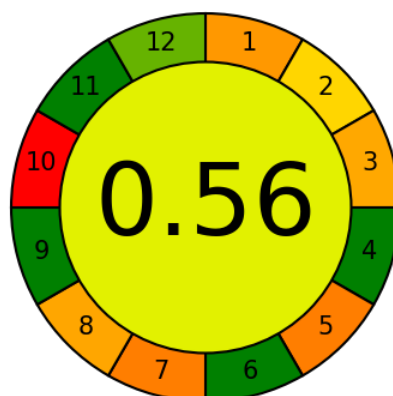


Figura 6: Pictograma AGREE da técnica HPLC-UV (valor=0,56) (Ruckmani et al., 2013)

### 3.2.3. Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 3

A avaliação da sustentabilidade da técnica de HPLC descrita no Artigo 3, realizada recorrendo à métrica AGREE, resultou num valor global (*score*) de 0,52, conforme ilustrado na Figura 7. O pictograma apresenta uma coloração amarelada no centro, correspondendo a um nível intermédio de sustentabilidade. O método requer um volume inicial de amostra reduzido (critério 2), cerca de 0,01 g, embora produza uma quantidade considerável de resíduos de reagentes (critério 7), que não derivam de fontes renováveis (critério 10). A produtividade analítica é moderada, permitindo a execução de seis ensaios por hora (critério 8). No que se refere à segurança do operador, a avaliação é positiva, evidenciada pela coloração verde no pictograma (critério 12), embora os reagentes utilizados possuam características tóxicas e inflamáveis (critério 11), implicando a necessidade de cuidados adequados durante a manipulação. Existem outros critérios que apresentam a coloração verde, uma vez que o método envolve poucos passos de preparação da amostra (critério 4), não requer derivatização (critério 6) e o consumo energético é baixo (critério 9).

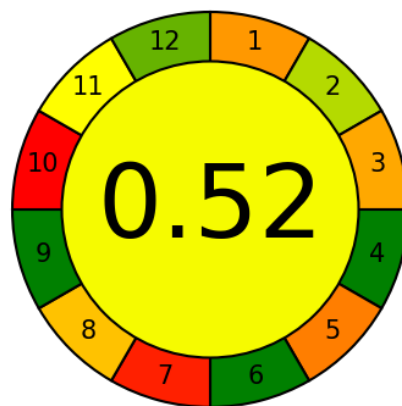


Figura 7: Pictograma AGREE da técnica HPLC-UV (valor=0,52) (Çağlar et al., 2022)

### 3.2.4. Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 4

A sustentabilidade da técnica de HPLC com detecção por fluorescência, aplicada no Artigo 4, foi avaliada através da métrica AGREE, tendo sido obtido um valor global (*score*) de 0,51, conforme demonstra a Figura 8. O pictograma evidencia uma coloração predominantemente amarelada, correspondente a um nível intermédio de sustentabilidade. O volume inicial de amostra requerido é de aproximadamente 1 mL, valor considerado adequado e favorável do ponto de vista analítico de acordo com o tipo de amostra (loção) (critério 2). No entanto, o método gera uma quantidade significativa de resíduos (critério 7). Os reagentes utilizados nesta técnica não são de origem renovável (critério 10). Acresce que, devido à utilização de uma fase móvel em gradiente, ocorre uma variação de composição ao longo da análise, implicando um maior consumo de solventes com reconhecida toxicidade (critério 11). Relativamente à segurança do operador, a avaliação apresenta-se positiva, como indicado pela coloração verde no pictograma (critério 12), contudo os consumíveis empregues possuem características tóxicas e inflamáveis, exigindo cuidados adicionais tanto na manipulação como no descarte dos mesmos. Analisando os restantes critérios alguns apresentam coloração verde, ou seja, revelam um maior alinhamento do método com a Química Analítica Verde, nomeadamente um número reduzido de etapas de preparação da amostra (critério 4), um procedimento semi-automático e miniaturizado (critério 5), e um consumo energético baixo (critério 9).

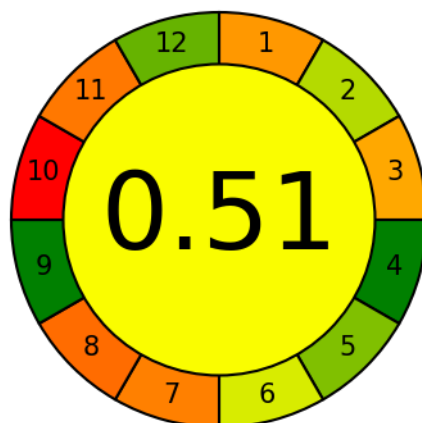


Figura 8: Pictograma AGREE da técnica HPLC com deteção por fluorescência (valor=0,51) (Shimekake et al., 2023)

### 3.2.5. Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 5

O método LC-MS, descrito no Artigo 5, foi submetido à avaliação da sustentabilidade através da métrica AGREE, tendo alcançado um valor global (*score*) de 0,3, o valor mais baixo observado entre os métodos analíticos analisados neste trabalho. Conforme ilustrado na Figura 9, o pictograma apresenta no centro uma coloração predominantemente laranja, o que traduz um nível de sustentabilidade reduzido. Esta técnica caracteriza-se por um número elevado de etapas até a conclusão da análise (critério 4), associado a um volume inicial de amostra relativamente elevado (critério 2), o que contribui para a diminuição da sustentabilidade do método. De referir que este método requer um elevado gasto energético devido à utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (critério 9), o que se traduz na diminuição da sustentabilidade. Não obstante, evidencia uma produtividade considerável, uma vez que possibilita a realização de mais de sete determinações no espaço de uma hora (critério 8). No que concerne aos reagentes, nenhum provém de fontes renováveis (critério 10), o que compromete ainda mais a sustentabilidade do método. Relativamente à segurança do operador, esta encontra-se globalmente assegurada (critério 12), ainda que os compostos envolvidos apresentem propriedades inflamáveis e tóxicas (critério 11), facto que exige uma adoção de medidas rigorosas de segurança laboratorial. Além da segurança do operador, este método apresenta mais dois critérios com pontuação favorável do ponto de vista da sustentabilidade, evidenciada pela coloração verde, uma vez que requer poucos passos de preparação da amostra (critério 4) e não requer derivatização (critério 6).

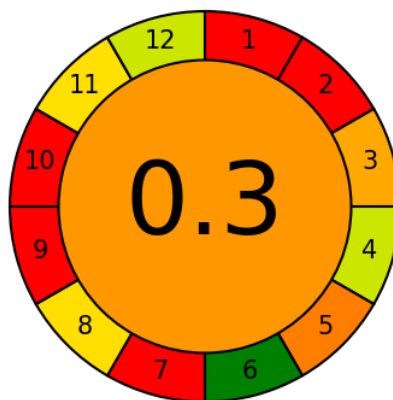


Figura 9: Pictograma AGREE da técnica LC-MS (valor=0,3) (Kühn et al., 2003)

### 3.2.6. Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 6

A avaliação da sustentabilidade da técnica de HPLC com deteção por fluorescência, de acordo com a métrica AGREE, resultou num valor global (*score*) de 0,54, conforme demonstra a Figura 10. O pictograma apresenta uma cor amarela-esverdeada, correspondendo a um nível intermédio de sustentabilidade. O volume inicial de amostra requerido é reduzido (critério 2), o que constitui um aspeto favorável na perspetiva da sustentabilidade do método. No entanto, a utilização de compostos como o reagente de derivatização FMOC-Cl (critério 6), caracterizado pela sua toxicidade (critério 11), contribui negativamente para a avaliação global do método. A produtividade é considerada moderada, uma vez que apenas é possível realizar quatro análises por hora (critério 8). Adicionalmente, nenhum dos reagentes utilizados são provenientes de fontes renováveis (critério 10), o que limita ainda mais a sustentabilidade da técnica. Em termos de segurança para o operador, a avaliação é positiva conforme indicado no pictograma, embora os reagentes empregues apresentem propriedades tóxicas e inflamáveis (critério 12). Para além dos critérios já mencionados, existem outros que apresentam coloração verde, uma vez que o método inclui um número reduzido de etapas de preparação da amostra (critério 4), o procedimento é semi-automático e é miniaturizado (critério 5) e o consumo energético é baixo (critério 9).

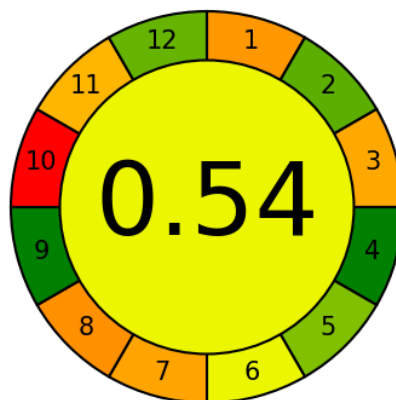


Figura 10: Pictograma AGREE da técnica HPLC com detecção por fluorescência (valor=0,54) (Harmita et al., 2020)

### 3.2.7. Avaliação da aplicação da métrica AGREE ao método analítico descrito no Artigo 7

O método de HPLC de exclusão por tamanho, descrito no Artigo 7, foi submetido à avaliação de sustentabilidade através da métrica AGREE, tendo obtido um valor global (*score*) de 0,56, conforme demonstra a Figura 11. O pictograma evidencia a coloração verde-claro ao centro, que representa um nível intermédio de sustentabilidade, considerado moderadamente favorável. O método requer um volume inicial de amostra reduzido, cerca de 1 mL (critério 2), o que apresenta um aspeto positivo do ponto de vista da sustentabilidade. Por outro lado, a técnica gera uma quantidade considerável de resíduos (critério 7) e recorre a reagentes que não são renováveis (critério 10), fatores que contribuem negativamente para a sua avaliação global. A produtividade analítica é considerada moderada (critério 8), dado que apenas é possível realizar quatro análises por hora. Relativamente à segurança do operador, esta apresenta-se favorável (critério 12), embora os reagentes utilizados possuam propriedades oxidantes e tóxicas (critério 11), implicado a necessidade de cuidados adequados no decorrer da preparação. Entre os parâmetros avaliados, quatro apresentaram pontuação mais elevada, evidenciada pela coloração verde mais intensa, o que reflete a conformidade do método com critérios de sustentabilidade. Esses parâmetros incluem um número reduzido de etapas de preparação da amostra (critério 4), um procedimento semi-automático e miniaturizado (critério 5), não ser necessário realizar derivatização (critério 6) e um consumo energético baixo (critério 9).

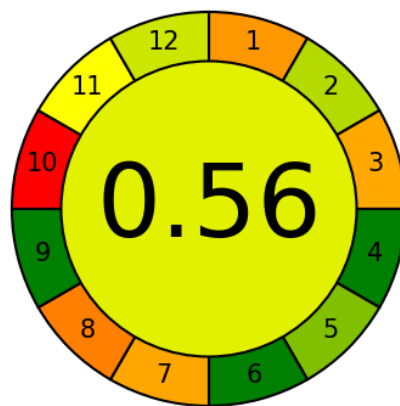


Figura 11: Pictograma AGREE da técnica HPLC-SEC (valor=0,56) (Suárez-Hernández et al., 2021)

### 3.3. Análise comparativa da revisão da literatura e da avaliação da sustentabilidade

A análise crítica das metodologias disponíveis para a quantificação do AH assume particular importância, na medida em que permite identificar não apenas a sua relevância científica, mas também a sua viabilidade prática de implementação. A conjugação entre os dados reportados na literatura e a avaliação da sustentabilidade através da métrica AGREE possibilita uma apreciação integrada, que ultrapassa a simples descrição técnica e evidencia aspetos determinantes como a exequibilidade laboratorial, a acessibilidade e disponibilidade dos equipamentos necessários, a especificidade analítica e o impacto ambiental e de segurança associado a cada método. Esta abordagem comparativa constitui, assim, uma ferramenta essencial para fundamentar a seleção do método que melhor concilie desempenho analítico, sustentabilidade e aplicabilidade prática, fornecendo bases sólidas para a sua implementação em contexto laboratorial.

Assim, a análise conjunta dos sete artigos revela-se imprescindível para uma compreensão aprofundada das potencialidades e limitações de cada técnica, permitindo identificar, de forma crítica, qual a abordagem metodológica mais adequada à quantificação do AH em termos de eficiência, robustez e sustentabilidade.

#### 3.3.1. Método carbazol

A técnica ou método do carbazol (MCM), baseada na reação espectrofotométrica do ácido hialurónico com o carbazol, revela-se limitada para a quantificação de AH em formulações complexas, uma vez que não distingue compostos individuais, apenas avalia a presença total de grupos urónicos (Bitter & Muir, 1962). Esta falta de especificidade afeta a precisão analítica, particularmente em amostras que contenham múltiplos componentes potencialmente interferentes. Além disso, a avaliação da "greenness" indicou um nível baixo de sustentabilidade (0,39), refletindo no uso de reagentes tóxicos e



não provenientes de fontes renováveis, bem como a geração de resíduos consideráveis. Estas características demonstram que o MCM não combina robustez analítica e responsabilidade ambiental, limitando a sua aplicabilidade em formulações complexas e sublinha a necessidade de métodos alternativos mais específicos e sustentáveis para a quantificação de AH.

### 3.3.2. Eletroforese capilar

A técnica de Eletroforese capilar (CZE), descrita no Artigo 1, utiliza um capilar de sílica com célula de bolha, revelando elevada sensibilidade e seletividade na quantificação de AH. O método apresenta uma produtividade reduzida, dado que apenas permite realizar duas análises por hora. Adicionalmente, a técnica é sensível a interferentes presentes em formulações complexas, o que pode comprometer a precisão analítica (Masár et al., 2020). O uso de capilar de sílica com célula de bolha implica cuidados específicos adicionais e manutenção rigorosa, aumentando a complexidade e custo do método. Do ponto de vista da sustentabilidade, embora haja algumas vantagens, como o reduzido volume de amostra inicial, a utilização de compostos não renováveis, potencialmente tóxicos e inflamáveis contribuem para a avaliação intermédia de “greenness” (0,5). Assim, apesar da sua precisão analítica, a CZE apresenta algumas limitações operacionais e ambientais que restringem a sua aplicabilidade prática em formulações mais complexas.

### 3.3.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem

A técnica de Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-ESI-MS/MS), descrita apenas no Artigo 5, foi aplicada em modo de ionização por *electrospray* (ESI) negativo. Embora este método apresente elevada sensibilidade e seletividade, a sua aplicabilidade apresenta limitações consideráveis. Para além da necessidade de cuidados adicionais na preparação das amostras, o método é complexo do ponto de vista instrumental, exigindo uma calibração rigorosa, controlo de parâmetros operacionais e posicionamento preciso do capilar para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A preparação das amostras envolve múltiplas etapas, o que aumenta o tempo de análise e contribui para a diminuição da sustentabilidade do método. Além disso, a técnica requer equipamentos de elevado custo e operadores especializados, o que limita a sua aplicabilidade em contextos laboratoriais com recursos limitados (Hernández et al., 2012). A avaliação pela métrica AGREE confirmou a baixa sustentabilidade da técnica (0,3), evidenciando não apenas a utilização de solventes tóxicos e não renováveis, mas também o impacto ambiental associado ao elevado consumo energético e à produção de resíduos. Assim, apesar da robustez analítica, a técnica de LC-MS/MS revela-se o método menos sustentável



entre os avaliados, apresentando uma relação pouco favorável entre desempenho e responsabilidade ambiental.

### 3.3.4. Cromatografia líquida acoplada a outros sistemas de detecção

Entre as metodologias cromatográficas avaliadas, a técnica de HPLC com detecção por UV ou fluorescência apresentam-se como um grupo de técnicas amplamente validadas na quantificação do AH. A sustentabilidade (*“greenness”*) foi avaliada para todas as técnicas de HPLC, apresentando estas valores próximos (0,51–0,56), exceto no Artigo 1, em que o maior volume de amostra inicial e a geração acrescida de resíduos reduziram a sustentabilidade (0,44). Assim, a comparação e seleção do método mais favorável recai essencialmente sobre os parâmetros analíticos. Apesar de partilharem características comuns de robustez e aplicabilidade, a escolha entre estas técnicas de HPLC depende sobretudo de aspetos como a sensibilidade, a seletividade, a linearidade, entre outros.

Neste contexto, a técnica de HPLC de exclusão por tamanho (HPLC–SEC) mostra-se adequada para a quantificação de AH, mas revela-se particularmente adequada para a caracterização da distribuição de pesos moleculares. O método descrito no Artigo 7 apresenta limitações significativas, nomeadamente o uso de detetor de índice de refração, cuja sensibilidade inferior à do UV pode comprometer a exatidão analítica, especialmente em amostras complexas ou com potenciais interferentes (Dolan, 2012). É importante salientar que os métodos HPLC–UV podem recorrer à coluna SEC para a quantificação de AH, o que permite uma análise precisa da substância em formulações complexas, mantendo a integridade da matriz e assegurando uma elevada reprodutibilidade dos resultados.

Na comparação entre os métodos HPLC–UV e HPLC–Fluorescência, a avaliação focou-se nos parâmetros analíticos de linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), essenciais para detetar e quantificar o AH em diferentes concentrações. De acordo com o Artigo 3, o método HPLC–UV apresentou uma faixa linear mais ampla, variando de 5 a 100 µg/mL, com LOD de 0,266 µg/mL e LOQ de 0,805 µg/mL, que são valores equivalentes ou até mais baixos em comparação com o método de HPLC–Fluorescência (Artigo 4 e Artigo 6). O menor LOD reflete a capacidade de o método identificar a presença do analito em concentrações mais baixas, reduzindo o risco de resultados falsos negativos. De forma complementar, o LOQ inferior assegura que as baixas concentrações possam ser quantificadas com precisão e exatidão, garantindo a fiabilidade dos resultados (Shrivastava, 2011). Além disso, a utilização da detecção por fluorescência implica, no caso do AH, um passo prévio de derivatização, o que torna o processo analítico mais moroso e complexo. Assim, o método HPLC–UV apresenta-se como a



técnica mais eficiente para a quantificação de AH em formulações mais complexas oferecendo elevada robustez analítica e confiança nos dados obtidos.

A análise crítica dos métodos avaliados evidencia que a deteção por HPLC-UV, conforme descrito no Artigo 3, apresenta melhor desempenho analítico, combinando elevada sensibilidade e robustez na deteção e quantificação do AH. Adicionalmente, a aplicação da métrica AGREE revelou que este método alcança um valor de sustentabilidade favorável, refletindo um equilíbrio adequado entre eficácia analítica e o impacto ambiental.

### 3.4. Elaboração do procedimento

O procedimento experimental proposto neste trabalho fundamenta-se na aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência com deteção UV, direcionada à deteção e quantificação do AH em formulações farmacêuticas. A adoção desta abordagem metodológica permite prever resultados analíticos caracterizados por uma elevada precisão, reprodutibilidade e sensibilidade, assegurando a fiabilidade necessária para a avaliação de compostos em matrizes complexas.

Para a separação cromatográfica, prevê-se a utilização de uma coluna SEC, adequada à análise de polímeros hidrofílicos de elevada massa molecular. Esta escolha justifica-se pela capacidade da coluna em garantir a seletividade e resolução necessárias para a deteção do AH, minimizando interferentes presentes em formulações farmacêuticas.

As amostras devem ser previamente dissolvidas em soluções aquosas controladas e filtradas através de membranas de porosidade adequada, assegurando a remoção de partículas em suspensão e preservando a integridade do analito. Esta etapa é essencial para evitar obstruções na coluna e garantir a consistência das análises.

Para a construção da curva de calibração e determinação dos parâmetros de validação, como linearidade, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), prevê-se a preparação de soluções *stock* de AH e, por diluição destas, soluções padrão de calibração. A fase móvel poderá consistir numa solução aquosa de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, previamente filtrada e desgaseificada, aplicada a um caudal de 1 mL/min. A coluna deve ser mantida nos 40 °C, enquanto o volume de injeção pode ser fixado nos 20 µL. A deteção deve ser realizada a 198 nm, comprimento de onda correspondente à máxima absorvância do analito em meio aquoso, garantindo elevada sensibilidade e especificidade.

Este procedimento apresenta uma base sólida para a quantificação robusta e reprodutível do AH em formulações farmacêuticas. O procedimento detalhado incluindo todas as etapas de preparação de soluções *stock* e amostra, condições experimentais e etapas analíticas do procedimento, encontra-se



disponível no Anexo 1, fornecendo uma ferramenta prática para a implementação em contexto laboratorial.

### 3.5. Implementação do protocolo

A implementação do protocolo desenvolvido para a deteção e quantificação de AH no CISA exige a verificação prévia da disponibilidade de todos os equipamentos, acessórios e consumíveis essenciais, assegurando que o método possa ser executado de forma eficaz, reprodutível e consistente em contexto laboratorial.

Para a implementação do método de quantificação de AH por HPLC-UV com coluna SEC, apenas os equipamentos essenciais para a implementação do protocolo devem ser considerados. Entre eles destacam-se:

- Sistema de HPLC Jasco® LC 4000 series: indispensável para a separação cromatográfica e deteção do analito;
- Balanças analíticas de alta precisão: necessárias para a pesagem rigorosa de reagentes e preparação das soluções *stock*;
- Vortex: garante a homogeneização completa das soluções, assegurando uniformidade nas amostras;
- Sistema de filtração de soluções (filtros de membrana): essencial para a remoção de partículas em suspensão antes da injeção no HPLC, prevenindo interferências no detetor;
- Banho de ultrassons: relevante para a preparação das amostras e da fase móvel, assegurando a homogeneidade e desgaseificação, de forma a evitar interferências.

É de salientar que, apesar da disponibilidade dos equipamentos acima referidos, a coluna SEC, componente crítico para a separação eficaz de polímeros hidrofílicos de elevada massa molecular e para a redução de interferentes, ainda não se encontra disponível no CISA. Assim, a aquisição desta coluna constitui uma condição imprescindível para a implementação total do protocolo e para assegurar a robustez e a fiabilidade analítica do método proposto. Testes preliminares poderão ser realizados com uma coluna contendo uma fase estacionária de interação hidrofílica.

Para viabilizar a implementação do protocolo no CISA, procedeu-se à avaliação de custos associados à aquisição da coluna de exclusão por tamanho OHPak SB-806M HQ, disponível no catálogo da VWR Avantor® por um valor aproximado de 1809,00 €. A execução do método requer a disponibilização de recursos financeiros específicos para colmatar esta necessidade instrumental e assegurar a aplicação prática do procedimento.



A implementação do protocolo requer ainda a utilização de AH padrão, essencial para a preparação das soluções de calibração e validação do método. De acordo com a oferta comercial da Sigma-Aldrich/Merck<sup>®</sup>, a aquisição de aproximadamente 500 mg de AH apresenta um custo de cerca de 191 €, valor que deverá ser considerado no orçamento destinado à execução do método no CISA.

Deste modo, a implementação do protocolo no CISA exige um investimento financeiro direcionado à aquisição dos materiais em falta, garantindo a execução completa e fiável do método. Considerando os custos previamente identificados, o orçamento total necessário para viabilizar a aplicação prática do protocolo foi estimado em 2000 €, valor que reflete exclusivamente os recursos adicionais indispensáveis, uma vez que os equipamentos principais já se encontram disponíveis no centro de investigação.



#### 4. Conclusão

Tendo em consideração os objetivos definidos para o presente trabalho, pode concluir-se que estes foram integralmente alcançados, uma vez que foi desenvolvido um protocolo analítico assente na cromatografia líquida de alta eficiência com deteção UV acoplado a coluna SEC, contemplando parâmetros analíticos robustos e apresentando uma avaliação de sustentabilidade favorável de acordo com a métrica AGREE. O protocolo delineado demonstrou elevado potencial de aplicabilidade prática, podendo ser implementado no CISA, embora para tal seja necessário assegurar financiamento complementar destinado à aquisição de uma coluna SEC e de ácido hialurónico padrão.

No que respeita a perspectivas futuras, destaca-se a implementação prática do protocolo em contexto laboratorial, acompanhada da validação completa do método segundo diretrizes internacionais, de forma a confirmar a sua reprodutibilidade, exatidão e aplicabilidade em diferentes matrizes. Para além disso, poderá ser considerada a expansão da metodologia a outros tipos de formulações ou mesmo a adaptação a técnicas complementares, potenciando a versatilidade do protocolo e reforçando a sua relevância no contexto da investigação aplicada e na garantia de qualidade em formulações farmacêuticas. Adicionalmente, propõe-se que a metodologia implementada seja avaliada tendo em conta outras ferramentas além da métrica AGREE, tais como as ferramentas GAPI (*Green Analytical Procedure Index*), RGB (*Red, Green, Blue Additive Color Model*) e BAGI (*Blue Applicability Grade Index*). A aplicação combinada destas métricas possibilitará não só aferir o grau de sustentabilidade da metodologia, mas também avaliar outras vertentes como a sua aplicabilidade e o impacto económico, contribuindo para uma avaliação mais completa, abrangente e integrada, com vista ao aumento futuro da sua sustentabilidade.



## Referências Bibliográficas

- Alkrad, J. A., Merstani, Y., & Neubert, R. H. H. (2002). New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *30*(4), 913–919. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00329-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00329-1)
- Bagga, H., Burkhardt, D., Sambrook, P., & March, L. (2006). Longterm effects of intraarticular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. *The Journal of Rheumatology*, *33*(5), 946–950.
- Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, *4*(4), 330–334. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)
- Brown, M. B., & Jones, S. A. (2005). Hyaluronic acid: A unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, *19*(3), 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>
- Çağlar, E., Üstündağ Okur, N., & Karasulu, Y. (2022). Development and validation of an HPLC method for the determination of hyaluronic acid active substance in pharmaceutical formulations. *Journal of Research in Pharmacy*, *26*, 112–122. <https://doi.org/10.29228/jrp.108>
- Chen, W. Y., & Abatangelo, G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *7*(2), 79–89. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.1999.00079.x>
- Colen, S., van den Bekerom, M. P. J., Mulier, M., & Haverkamp, D. (2012). Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *BioDrugs*, *26*(4), 257–268. <https://doi.org/10.1007/BF03261884>
- Dolan, J. (2012). *Avoiding Refractive Index Detector Problems*. *30*, 1032–1037.
- Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers*, *10*(7), 701. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>



- Gałaszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
- Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*, 80(21), 1921–1943. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.037>
- Harmita, H., . H., & GEOFANI, M. (2020). Quantification of Hyaluronic Acid and Methylsulfonylmethane in Dietary Supplements. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 143–148. <https://doi.org/10.22159/ijap.2020.v12s1.FF032>
- Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., & Mattioli, L. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(5), 1251–1264. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5844-7>
- Higashide, T., & Sugiyama, K. (2008). Use of viscoelastic substance in ophthalmic surgery – focus on sodium hyaluronate. *Clinical Ophthalmology*, 2(1), 21–30. <https://doi.org/10.2147/opth.s1439>
- Hsu, T.-F., Su, Z.-R., Hsieh, Y.-H., Wang, M.-F., Oe, M., Matsuoka, R., & Masuda, Y. (2021). Oral Hyaluronan Relieves Wrinkles and Improves Dry Skin: A 12-Week Double-Blinded, Placebo-Controlled Study. *Nutrients*, 13(7), 2220. <https://doi.org/10.3390/nu13072220>
- Huang, G., & Huang, H. (2018). Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Delivery*, 25(1), 766–772. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>
- Illum, L. (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00087-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00087-7)
- Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2011). Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiological Reviews*, 91(1), 221–264. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2009>



- Kawada, C., Yoshida, T., Yoshida, H., Matsuoka, R., Sakamoto, W., Odanaka, W., Sato, T., Yamasaki, T., Kanemitsu, T., Masuda, Y., & Urushibata, O. (2014). Ingested hyaluronan moisturizes dry skin. *Nutrition Journal*, *13*(1), 70. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-70>
- Kühn, A. V., Raith, K., Sauerland, V., & Neubert, R. H. H. (2003). Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *30*(5), 1531–1537. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(02\)00544-7](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(02)00544-7)
- Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M. S., Gauto, A. R., & Grzela, T. (2016). Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. *Wounds*, *28*(3), 78–88.
- Marinho, A., Nunes, C., & Reis, S. (2021). Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. *Biomolecules*, *11*(10), Artigo 10. <https://doi.org/10.3390/biom11101518>
- Masár, M., Hradski, J., Schmid, M. G., & Szucs, R. (2020). Advantages and Pitfalls of Capillary Electrophoresis of Pharmaceutical Compounds and Their Enantiomers in Complex Samples: Comparison of Hydrodynamically Opened and Closed Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6852. <https://doi.org/10.3390/ijms21186852>
- Medina, J. M., Thomas, A., & Denegar, C. R. (2006). Knee osteoarthritis: Should your patient opt for hyaluronic acid injection? *The Journal of Family Practice*, *55*(8), 669–675.
- Moreland, L. W. (2003). Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: Mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*, *5*(2), 54. <https://doi.org/10.1186/ar623>
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinarni medicina*, *53*(8), 397–411.
- Oliviero, F., Ramonda, R., Hoxha, A., Scanu, A., Galozzi, P., Favero, M., Frallonardo, P., & Punzi, L. (2020). Effect of an oral preparation containing hyaluronic acid, chondroitin sulfate, hydrolyzed collagen



- type II and hydrolyzed keratin on synovial fluid features and clinical indices in knee osteoarthritis. A pilot study. *Reumatismo*, 72(3), 125–130. <https://doi.org/10.4081/reumatismo.2020.1272>
- Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 253–258.
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*, 92(14), 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- Ruckmani, K., Shaikh, S. Z., Khalil, P., Muneera, M. S., & Thusleem, O. A. (2013). Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(5), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.001>
- Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2022). Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*, 238, 123046. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123046>
- Salwowska, N. M., Bebenek, K. A., Żądło, D. A., & Wcisło-Dziadecka, D. L. (2016). Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: A systematic review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(4), 520–526. <https://doi.org/10.1111/jocd.12237>
- Shaharudin, A., & Aziz, Z. (2016). Effectiveness of hyaluronic acid and its derivatives on chronic wounds: A systematic review. *Journal of Wound Care*, 25(10), 585–592.
- Shimekake, M., Komeno, M., Taguchi, M., Katsumoto, S., Tanda, Y., Sato, K., Wada, T., Toida, T., & Higashi, K. (2023). Analysis of Acetylated Hyaluronic Acid in Moisturizing Lotion and Milk Lotion by HPLC with Fluorescence Detection. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 71(7), 616–619. <https://doi.org/10.1248/cpb.c23-00094>
- Shrivastava, A. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2, 21–25. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>



- Stern, R., Asari, A. A., & Sugahara, K. N. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85(8), 699–715. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>
- Suárez-Hernández, L. A., Camacho-Ruíz, R. M., Arriola-Guevara, E., Padilla-Camberos, E., Kirchmayr, M. R., Corona-González, R. I., & Guatemala-Morales, G. M. (2021). Validation of an Analytical Method for the Simultaneous Determination of Hyaluronic Acid Concentration and Molecular Weight by Size-Exclusion Chromatography. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5360. <https://doi.org/10.3390/molecules26175360>
- Tamer, T. M. (2013). Hyaluronan and synovial joint: Function, distribution and healing. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(3), 111–125. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0019>
- Tobiszewski, M., Marć, M., Gałuszka, A., & Namieśnik, J. (2015). Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules*, 20(6), Artigo 6. <https://doi.org/10.3390/molecules200610928>
- Valachová, K., Hassan, M. E., & Šoltés, L. (2024). Hyaluronan: Sources, Structure, Features and Applications. *Molecules*, 29(3), Artigo 3. <https://doi.org/10.3390/molecules29030739>
- Zhang, X., Wei, D., Xu, Y., & Zhu, Q. (2021). Hyaluronic acid in ocular drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 264, 118006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118006>



## Anexos

### Anexo 1 – Protocolo para a Detecção e Quantificação de Ácido Hialurónico pela Técnica de HPLC-UV



## Detecção e Quantificação de Ácido Hialurónico pela Técnica HPLC-UV

---

Este protocolo apresenta, de forma sistematizada, o procedimento experimental para a deteção e quantificação de ácido hialurónico (AH) em formulações farmacêuticas, recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com deteção UV, utilizando uma coluna de exclusão por tamanho (SEC).

### Protocolo

#### Condições cromatográficas

- Coluna SEC
- Fase móvel: 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  previamente filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ) e desgaseificada
- Equilíbrio da coluna: circulação da fase móvel no sistema durante, pelo menos, 1 hora antes da primeira injeção
- Caudal: 1,0 mL/min
- Temperatura da coluna: 40 °C
- Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$
- Deteção: UV a 198 nm
- Tempo de corrida: 10 minutos

#### Parte 1 – Determinação dos parâmetros de validação e da curva de calibração

1. Preparação da solução *stock*
  - 1.1. Pesar com rigor 10 mg de AH padrão;
  - 1.2. Dissolver em 100 mL de solução aquosa de NaCl 0,9% para preparar a solução *stock* (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
  - 1.3. Armazenar a  $4 \pm 1$  °C em frasco protegido da luz.
2. Preparação das soluções padrão
  - 2.1. Preparar diluições da solução *stock* para obter concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;



## Anexo 1 – Continuação



- 2.2. Filtrar todas as soluções recorrendo a filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  antes da injeção.
3. Construção da curva de calibração
  - 3.1. Injetar cada solução padrão em triplicado nas condições cromatográficas estabelecidas;
  - 3.2. Registrar as áreas de pico correspondentes;
  - 3.3. Construir a curva de calibração (concentração vs área de pico).
4. Determinação de parâmetros de validação
  - 4.1. Avaliar a precisão e exatidão do método por análise ( $n=6$ ) de soluções padrão de controlo de qualidade em três níveis de concentração (10, 40, 100  $\mu\text{g/mL}$ ), em três dias diferentes;
  - 4.2. Determinar o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) por injeção de brancos (solvente;  $n=10$ ) e aplicação da estratégia sinal/ruído.

**Parte 2 – Análise das amostras farmacêuticas**

1. Preparação das amostras
  - 1.1. Dissolver a amostra em solução de NaCl 0,9% em condições controladas;
  - 1.2. Filtrar a solução obtida através de filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$
2. Análise cromatográfica
  - 2.1. Injetar 20  $\mu\text{L}$  da amostra nas mesmas condições cromatográficas que as soluções padrão;
  - 2.2. Determinar a concentração de AH por interpolação na curva de calibração estabelecida.

**P.PORTO**

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**M** **MESTRADO**  
FARMÁCIA