

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
CURSO DE DOUTORADO EM QUÍMICA – ASSOCIAÇÃO AMPLA
UEL/UEPG/UNICENTRO

GISELLE NATHALY CALAÇA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS UTILIZANDO
PLANEJAMENTO FATORIAL PARA DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE
ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS E COSMÉTICAS**

PONTA GROSSA

2015

GISELLE NATHALY CALAÇA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS UTILIZANDO
PLANEJAMENTO FATORIAL PARA DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE
ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS E COSMÉTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química, Curso de Doutorado em Química -
Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da
Universidade Estadual de Ponta Grossa para
obtenção do título de Doutora em Química.

***Orientadora:** Profa. Dra. Noemi Nagata*

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

C141 Calaça, Giselle Nathaly
Desenvolvimento de métodos
voltamétricos utilizando planejamento
fatorial para determinações simultâneas de
associações farmacêuticas e cosméticas/
Giselle Nathaly Calaça. Ponta Grossa,
2015.
118f.

Tese (Doutorado em Química - Área de
Concentração: Química), Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Universidade
Estadual de Londrina e Universidade
Estadual do Centro Oeste.

Orientadora: Profª Drª Noemi Nagata.

1.Ácido Kójico. 2.Hidroquinona.
3.Sulfametoxazol. 4.Trimetoprima.
5.Carbono Vítreo. I.Nagata, Noemi. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Universidade Estadual de Londrina.
Universidade Estadual do Centro Oeste.
Doutorado em Química. III. T.

CDD: 545

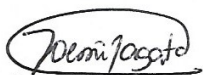
TERMO DE APROVAÇÃO

Giselle Nathaly Calaça

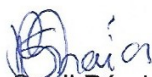
“DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS DE ASSOCIAÇÕES FARMACÊUTICAS E COSMÉTICAS.”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:



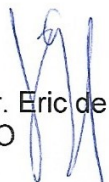
Profa. Dra. Noemi Nagata
UEPG/UFPR/PR



Profa. Dra. Sueli Pécio Quinaia
UNICENTRO/PR



Prof. Dr. Cesar Ricardo Teixeira Tarley
UEL/PR



Prof. Dr. Eric de Souza Gil
UFG/GO



Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos
UFVJM/MG

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2015.

*Dedico este trabalho ao meu esposo
César, aos meus pais Vilma e Élio, a
minha irmã Michelle e aos meus
sobrinhos Lucas e Amanda.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus que deu seu único seu filho Jesus Cristo em sacrifício, para que todos aqueles que nele creem não pereçam; esse Deus tão maravilhoso, que dia após dia dá provas de sua existência e de seu amor por mim. Obrigada meu Senhor!

Ao meu amado esposo César, pela compreensão, carinho e apoio incondicional nos momentos mais difíceis. Tenho plena certeza de que foi o seu incentivo e seu amor que me ajudaram a chegar até aqui. Amo muito você!

Aos meus pais Vilma e Élio, a minha irmã Michelle, aos meus sobrinhos e a todos os meus familiares por todo amor, dedicação, apoio e incentivo.

À minha querida orientadora e grande incentivadora Profa. Dra. Noemi Nagata, pela orientação, amizade, paciência e pelos seus ensinamentos que contribuíram muito para meu desenvolvimento pessoal e crescimento científico. MUITÍSSIMO obrigada!

Aos professores da pós-graduação em química, em especial às professoras Dra. Christiana Andrade Pessoa e Dra. Karen Wohnrath, que com carinho e muita paciência, sempre atenderam as minhas mais diversas solicitações.

À UFPR, em especial ao Professor Dr. Patricio G. Peralta-Zamora e as pós-graduandas Sandrictha e Bianquitcha, pelas medidas cromatográficas, pela hospitalidade e disponibilidade em me ajudar.

À banca de qualificação e defesa por aceitarem o convite e contribuírem muito para continuação e conclusão desta tese com colocações pertinentes.

Aos que fazem, ou fizeram parte, do grupo de desenvolvimento de eletrodos modificados (GDEM), que de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, além das manifestações de carinho, amizade, paciência e pelos momentos de descontração que tornaram os meus dias mais alegres.

À minha amiga e companheira de doutorado, Marcelitcha.

À Fundação Araucária e a Capes pela bolsa concedida.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tiveram sua parcela de participação durante a execução e conclusão desta tese.

*“... ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; ainda que decepcione o produto da oliveira, e os campos não produzam mantimento; ainda que as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja gado;
Todavia eu me alegrarei no Senhor; exultarei no Deus da minha salvação”.
(Habacuque 3:17-18)*

RESUMO

O trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para quantificação de duas associações, os antibióticos: sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP); e os agentes despigmentantes: ácido kójico (AK) e hidroquinona (HQ), empregando-se eletrodo de carbono vítreo (ECV) não modificado e voltametria de onda quadrada (VOQ). Para a primeira associação, dois picos de oxidação irreversíveis em 0,96V (SMX) e 1,12V (TMP) foram observados em tampão Britton–Robinson (pH 6,0), caracterizados por processos difusional e adsorptivo, respectivamente. Os parâmetros instrumentais da VOQ foram otimizados por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 , sendo a melhor resposta em termos de sensibilidade e seletividade obtida em $a=30$ mV, $f=100$ s⁻¹ e $\Delta E_s=5$ mV. Nas condições otimizadas, foram construídas curvas analíticas nos intervalos de concentração de $5,5 \times 10^{-5}$ a $3,95 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($R=0,9971$) para SMX e $1,05 \times 10^{-5}$ a $1,04 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($R=0,9974$) para TMP. Os valores de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) calculados foram: $8,52 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $2,84 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para SMX e $9,31 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $3,10 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para TMP, respectivamente. O método proposto foi aplicado para determinação simultânea dos fármacos em diferentes amostras farmacêuticas (comprimidos, injeção e suspensão oral) sem a necessidade de nenhum tipo de pré-tratamento da amostra. Os resultados obtidos através do método voltamétrico foram comparados aos obtidos pelo método farmacopeico (HPLC) e comprovou-se que não há diferença significativa em um nível de confiança de 95%. Para a segunda associação, nos voltamogramas cíclicos em tampão McIlvaine (pH=8,0) um pico de oxidação irreversível em +0,7V foi observado para o AK, enquanto que para HQ foi observado um processo quase-reversível, com picos de oxidação em 0,08V e redução em -0,02V, caracterizados por processos adsorptivo e difusional, respectivamente. Utilizando-se os parâmetros da VOQ otimizados ($a=40$ mV, $f=40$ s⁻¹ e $\Delta E_s=1$ mV), através de um planejamento fatorial completo 2^3 , as curvas de calibração foram obtidas nas faixas de concentração de $3,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($R=0,9996$) para AK e $1,5 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ ($R=0,9994$) para HQ. Os limites de detecção e quantificação foram: $7,84 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $2,61 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para AK; e $3,71 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,24 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para HQ, respectivamente. O método voltamétrico desenvolvido foi validado em termos de especificidade, linearidade, faixa de concentração, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e aplicado na determinação simultânea dos agentes despigmentantes em amostras de clareadores.

Palavras-Chave: Ácido Kójico, Hidroquinona, Sulfametoxazol, Trimetoprima, Carbono Vítreo, Voltametria de Onda Quadrada, Planejamento Fatorial de Experimentos, Formulações Farmacêuticas.

ABSTRACT

The development and validation of analytical methods for quantification of two associations, antibiotics: sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP); and depigmenting agents: kojic acid (AK) and hydroquinone (HQ), using unmodified glassy carbon electrode (ECV) and square wave voltammetry (SWV) are described. For the first association, two well defined irreversible oxidation peaks were obtained at 0.96V (SMX) and 1.12V (TMP) in Britton–Robinson buffer (pH 6.0), characterized by diffusion and adsorptive processes, respectively. SWV parameters were optimized by means of 2^3 Full Factorial Design, and the best analytical signal, in terms of sensitivity and selectivity is obtained at $a=30$ mV, $f=100$ s⁻¹ and $\Delta E_s=5$ mV. Under optimized conditions, SWV measurements showed excellent linear response, from 5.5×10^{-5} to 3.95×10^{-4} mol L⁻¹ ($R=0.9971$) and 1.05×10^{-5} to 1.04×10^{-4} mol L⁻¹ ($R=0.9974$) for SMX and TMP, respectively. The detection and quantification limits were found to be 8.52×10^{-6} mol L⁻¹ and 2.84×10^{-5} mol L⁻¹ for SMX; and 9.31×10^{-7} mol L⁻¹ and 3.10×10^{-6} mol L⁻¹ for TMP, respectively. The proposed method was successfully applied to the simultaneous determination of these antibiotics in commercial pharmaceutical formulations (tablets, oral suspension and injection), without any sample pretreatment. The obtained results are in good agreement with that obtained by the standard HPLC method at a 95% confidence level. For the second association, the redox peak potentials were completely separated in McIlvaine buffer solution (pH 8.0), KA exhibits a well-defined irreversible oxidation peak at 0.72V and HQ a quasi-reversible redox peak at 0.08 V and -0.02 V, characterized by adsorptive and diffusional processes, respectively. Under SWV parameters optimized ($a=40$ mV, $f=40$ s⁻¹ and $\Delta E_s=1$ mV) by 2^3 Full Factorial Design, the calibration curves were obtained in the concentration ranges of 3.5×10^{-5} to 2.5×10^{-4} mol L⁻¹ ($R=0.9996$) for kojic acid and 1.5×10^{-5} to 1.6×10^{-4} mol L⁻¹ ($R=0.9994$) for hydroquinone. The detection and quantification limits were found to be 7.84×10^{-6} mol L⁻¹ and 2.61×10^{-5} mol L⁻¹ for KA; and 3.71×10^{-6} mol L⁻¹ and 1.24×10^{-5} mol L⁻¹ for HQ, respectively. The novel electroanalytical method was validated in terms of specificity, linearity, range, accuracy and precision (repeatability and intermediate precision) and successfully applied to the direct simultaneous determination of these bleaching agents in real samples.

Keywords: Kojic Acid, Hydroquinone, Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Glassy Carbon Electrode, Square Wave Voltammetry, Full Factorial Design, Pharmaceutical Formulations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Aplicação do potencial na voltametria cíclica (A) e voltamograma cíclico típico para um processo redox reversível (B).....	24
Figura 02.	Voltamogramas cíclicos para um processo reversível (a), quase-reversível (b) e irreversível (c).....	25
Figura 03.	Sinal de excitação para a voltametria de pulso diferencial (A) e voltamograma de pulso diferencial resultante (B).....	27
Figura 04.	Representação do potencial em forma de onda quadrada (A) e um cliço de potencial (B).....	28
Figura 05.	Voltamogramas de onda quadrada (A) processo redox de um sistema reversível e (B) processo redox de um sistema irreversível.....	29
Figura 06.	Estrutura do carbono vítreo, onde La e Lc são as dimensões das fibrilas gráficas.....	32
Figura 07.	Estrutura química do sulfametoxazol (A) e da trimetoprima (B).....	36
Figura 08.	Representação esquemática da formação de melanina.....	39
Figura 09.	Estrutura química do ácido kójico (A) e da hidroquinona (B).....	40
Figura 10.	Célula eletroquímica contendo três eletrodos conectados ao potenciostato/galvanostato μ -Autolab, ambos conectados a um computador para aquisição de dados.....	55
Figura 11.	(A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de sulfametoxazol a $v = 50$ mV s ⁻¹ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $1,70 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de sulfametoxazol, com $f = 100$ s ⁻¹ , $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR pH= 6.	61
Figura 12.	Esquema de oxidação do sulfametoxazol.....	62
Figura 13.	Voltamogramas cíclicos de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de sulfametoxazol em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s ⁻¹) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR, pH 6.....	62
Figura 14.	(A) Dependência da variação de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura (B) Dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.....	63
Figura 15.	(A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $1,50 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de trimetoprima a $v = 50$ mV s ⁻¹ (B) Voltamogramas de onda quadrada de	63

	1,05x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de trimetoprima, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR, pH =6.....	
Figura 16.	Esquema de oxidação da trimetoprima.....	64
Figura 17.	(A) Voltamogramas cíclicos de 2,73x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de trimetoprima em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s ⁻¹) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR, pH 6.....	64
Figura 18.	(A) Dependência da variação de corrente de pico com a velocidade de varredura (mV s ⁻¹) (B) Dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.....	65
Figura 19.	Relação entre pH e potencial de pico (eixo y-esquerdo) e corrente de pico (eixo y-direito) para (A) trimetoprima e (B) sulfametoxazol em 0,04 mol L ⁻¹ de tampão BR sobre eletrodo de carbono vítreo.....	66
Figura 20.	Interpretação geométrica do efeito de interação <i>amplitude vs. incremento vs. frequência</i> do planejamento fatorial 2 ³ para o sulfametoxazol.....	68
Figura 21.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de sulfametoxazol, em tampão BR (pH=6) sobre o eletrodo de carbono vítreo, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=4\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	69
Figura 22.	Interpretação geométrica dos efeitos de interação (A) <i>amplitude vs. frequência</i> e (B) <i>amplitude vs. incremento</i> do planejamento fatorial 2 ³ para a trimetoprima.....	71
Figura 23.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de trimetoprima, em tampão BR (pH=6) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	72
Figura 24.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de sulfametoxazol, em tampão BR pH=6, sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	74
Figura 25.	(A) Voltamogramas de onda quadrada para misturas de sulfametoxazol e trimetoprima sobre eletrodo de carbono vítreo em tampão BR, pH=6, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$	76
Figura 26.	(A) Curva analítica para determinação voltamétrica de sulfametoxazol. (B) Curva analítica para determinação voltamétrica de trimetoprima.....	77
Figura 27.	Voltamogramas de onda quadrada para as diferentes amostras de medicamentos (comprimidos, suspensão oral e solução injetável) e	79

	padrão de SMX/TMP em tampão BR, pH=6 obtidos sobre eletrodo de carbono vítreo, $a=30\text{ mV}$, $f=100\text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_s=5\text{ mV}$	
Figura 28.	(A) Cromatogramas (HPLC/DAD) obtidos para misturas de sulfametoxazol e trimetoprima em diferentes concentrações. Curvas analíticas para sulfametoxazol (B) e trimetoprima (C).....	80
Figura 29.	(A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de ácido kójico a $v=50\text{ mV s}^{-1}$ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de ácido kójico, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH=8.....	82
Figura 30.	Esquema de oxidação do ácido kójico.....	83
Figura 31.	(A) Voltamogramas cíclicos de $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de ácido kójico em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH 8. (B) Dependência da variação de corrente de pico com a velocidade de varredura (mV s^{-1}).....	83
Figura 32.	(A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona a $v=50\text{ mV s}^{-1}$ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH=8.....	84
Figura 33.	Esquema de oxidação da hidroquinona.....	84
Figura 34.	(A) Voltamogramas cíclicos de $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH 8. (B) Dependência da variação de corrente de pico com a $v^{1/2}$ (mV s^{-1}).....	85
Figura 35.	Relação entre pH e potencial de pico (eixo y-esquerdo) e corrente de pico (eixo y-direito) para ácido kójico (B) e hidroquinona(A) em $0,04\text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR sobre eletrodo de carbono vítreo.....	86
Figura 36.	Interpretação geométrica do efeito de interação <i>amplitude vs. incremento vs. frequência</i> do planejamento fatorial 2^3 para o ácido kójico.....	88
Figura 37.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de ácido kójico, em tampão McIlvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=80\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=3\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	89
Figura 38.	Interpretação geométrica do efeito de interação <i>amplitude vs. frequência</i> do planejamento fatorial 2^3 para hidroquinona.....	92

Figura 39.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de hidroquinona, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	93
Figura 40.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de ácido kójico, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	95
Figura 41.	(A) voltamogramas de onda quadrada para misturas de hidroquinona e ácido kójico em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre o eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$	95
Figura 42.	(A) Curva analítica para determinação voltamétrica de hidroquinona. (B) Curva analítica para determinação voltamétrica de ácido kójico.....	96
Figura 43.	(A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $9,3 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico a $v=50\text{ mV s}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão Mcllvaine, pH=8.....	100
Figura 44.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de ácido ascórbico, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	100
Figura 45.	Voltamogramas cíclicos para o branco e $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de metabissulfito de sódio a $v=50\text{ mV s}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão Mcllvaine, pH=8.....	101
Figura 46.	(A) Voltamogramas de onda quadrada de metabissulfito de sódio, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$. (B) Curva analítica.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Parâmetros físico-químicos do sulfametoxazol e da trimetoprima.....	36
Tabela 02:	Determinação voltamétrica da associação sulfametoxazol e trimetoprima.....	38
Tabela 03:	Exemplos de determinação voltamétrica individual de ácido kójico ou hidroquinona em cosméticos.....	42
Tabela 04.	Faixas de variação e valores estabelecidos como padrões para estudo preliminar univariado dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.	52
Tabela 05.	Variáveis e níveis estudados nas otimizações dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	53
Tabela 06.	Matriz do planejamento fatorial 2^3 para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada.....	54
Tabela 07.	Amostras reais analisadas contendo sulfametoxazol e trimetoprima.....	56
Tabela 08.	Ensaio de recuperação de ácido kójico e hidroquinona para determinação da exatidão e especificidade.....	58
Tabela 09.	Amostras reais de clareadores (base gel e creme), contendo ácido kójico e hidroquinona obtidos em farmácias de manipulação da região de Ponta Grossa/PR.....	60
Tabela 10.	Resultados da otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o sulfametoxazol, via planejamento fatorial 2^3 ...	67
Tabela 11.	Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o sulfametoxazol, via planejamento fatorial 2^3	67
Tabela 12.	Resultados da otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para a trimetoprima, via planejamento fatorial 2^3	70
Tabela 13.	Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para a trimetoprima, via planejamento fatorial 2^3	70
Tabela 14.	Resultados dos ensaios de recuperação de trimetoprima, em tampão BR (pH=6), sobre eletrodo de carbono vítreo, com $f= 100\text{ s}^{-1}$, $a= 30\text{ mV}$, $\Delta Es= 5\text{ mV}$	73
Tabela 15.	Resultados dos ensaios de recuperação de sulfametoxazol em tampão	75

	BR (pH=6), sobre eletrodo de carbono vítreo, com $f= 100\text{ s}^{-1}$, $\alpha= 30\text{ mV}$, $\Delta Es= 5\text{ mV}$	
Tabela 16.	Estudo da precisão das medidas sobre eletrodo de carbono vítreo em tampão BR, pH= 6.....	75
Tabela 17.	Resultados da recuperação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR (pH= 6), $f= 100\text{ s}^{-1}$, $\alpha= 30\text{ mV}$, $\Delta Es= 5\text{ mV}$	78
Tabela 18.	Resultados da determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em diferentes amostras de medicamentos, utilizando-se o método oficial (HPLC) e o método proposto (VOQ).....	81
Tabela 19.	Resultados da otimização via planejamento fatorial 2^3 dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o ácido kójico.....	87
Tabela 20.	Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o ácido kójico, via planejamento fatorial completo 2^3	88
Tabela 21.	Resultados da recuperação de ácido kójico sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine (pH=8), com $f= 80\text{ s}^{-1}$, $\alpha= 40\text{ mV}$, $\Delta Es= 3\text{ mV}$	90
Tabela 22.	Resultados da otimização via planejamento fatorial 2^3 dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para a hidroquinona.....	91
Tabela 23.	Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para hidroquinona via planejamento fatorial completo 2^3	91
Tabela 24.	Resultados do ensaio de recuperação para determinação individual de hidroquinona sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine (pH= 8), $f= 40\text{ s}^{-1}$, $\alpha= 40\text{ mV}$, $\Delta Es= 1\text{ mV}$	94
Tabela 25.	Resultados da recuperação simultânea de hidroquinona e ácido kójico sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine (pH= 8), $f= 40\text{ s}^{-1}$, $\alpha= 40\text{ mV}$, $\Delta Es= 1\text{ mV}$	97
Tabela 26.	Resultados da determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona em amostras de clareadores (gel e creme) utilizando-se o método voltamétrico proposto.....	98
Tabela 27.	Resultados do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrida).....	104

Tabela 28.	Resultados do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corrida).....	104
Tabela 29.	Resultados da determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona em amostras de clareadores (gel e creme) utilizando-se o método voltamétrico proposto.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta E_{p/2}$	Largura de meia altura do pico de potencial
ΔE_s	Incremento de varredura de potenciais
a	Amplitude do pulso
AA	Ácido Ascórbico
AK	Ácido Kójico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BR	Britton-Robinson
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo (sinônimo de CV)
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
E_p	Potencial de pico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
f	Frequência de aplicação dos pulsos de potenciais
HPLC	Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE, em inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography, HPLC</i>)
HQ	Hidroquinona
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
I_p	Corrente de pico
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MTB	Metabissulfito de Sódio
SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprima

USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
v	Velocidade de varredura de potencial
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso diferencial
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Eletroanalítica	22
1.1.1 <i>Voltametria Cíclica</i>	24
1.1.2 <i>Voltametria de Pulso Diferencial</i>	26
1.1.3 <i>Voltametria de Onda Quadrada</i>	27
1.1.3.1 <i>Aplicações em Análises Farmacêuticas</i>	29
1.2 Eletrodo de Carbono vítreo	31
1.2.1 <i>Eletrodo de Carbono Vítreo na Análise Farmacêutica</i>	33
1.3 Associações Farmacêuticas e Cosméticas	35
1.3.1 <i>Sulfametoxazol e Trimetoprima</i>	35
1.4.1.1 <i>Métodos para Quantificação de Sulfametoxazol e Trimetoprima</i>	37
1.3.2 <i>Ácido Kójico e Hidroquinona</i>	39
1.4.2.1 <i>Métodos para Quantificação de Ácido Kójico e/ou Hidroquinona</i>	41
1.4 Quimiometria	43
1.4.1 <i>Planejamento e Otimização de Experimentos</i>	43
1.5 Validação de Método Analítico	45
1.5.1 <i>Especificidade e Seletividade</i>	46
1.5.2 <i>Linearidade e Intervalo</i>	46
1.5.3 <i>Exatidão</i>	47
1.5.4 <i>Precisão</i>	47
1.5.1 <i>Robustez</i>	48
1.5.2 <i>Limite de detecção</i>	48
1.5.3 <i>Limite de quantificação</i>	49
2. OBJETIVO GERAL	50
2.1 Objetivos Específicos	50
3. Materiais e métodos	51
3.1 Reagentes	51
3.1.1 <i>Fármacos e ativos</i>	51

3.2	Preparo de Soluções	51
3.3	Eletrodo de Carbono Vítreo	52
3.4	Planejamento Fatorial.....	52
3.5	Medidas Voltamétricas	54
3.6	Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	55
3.7	Análise de Amostras Reais contendo SMX e TMP.....	55
	<i>3.7.1 Preparo das Amostras para Análise por Cromatografia</i>	<i>56</i>
	<i>3.7.2 Preparo das Amostras para Análise por Voltametria</i>	<i>57</i>
3.8	Parâmetros de Validação do Método Voltamétrico para Determinação Ácido Kójico e Hidroquinona	57
	<i>3.8.1 Exatidão e Especificidade</i>	<i>57</i>
	<i>3.8.2 Linearidade e Intervalo</i>	<i>58</i>
	<i>3.8.3 Precisão</i>	<i>59</i>
	<i>3.8.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	<i>59</i>
3.9	Análise de Amostras Reais contendo AK e HQ	59
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1	Associação Sulfametoxazol e Trimetoprima	61
	<i>4.1.1 Comportamento voltamétrico do sulfametoxazol sobre ECV.....</i>	<i>61</i>
	<i>4.1.2 Comportamento voltamétrico da trimetoprima sobre ECV</i>	<i>63</i>
	<i>4.1.3 Influência do pH na resposta voltamétrica de SMX e TMP</i>	<i>65</i>
	<i>4.1.4 Análise individual de sulfametoxazol</i>	<i>66</i>
	<i>4.1.4.1 Otimização dos parâmetros da VOQ para determinação de SMX</i>	<i>66</i>
	<i>4.1.4.2 Curva analítica otimizada para determinação individual de SMX.....</i>	<i>68</i>
	<i>4.1.5 Obtenção das condições otimizadas para determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima</i>	<i>69</i>
	<i>4.1.5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais da VOQ</i>	<i>69</i>
	<i>4.1.5.2 Curva analítica para determinação individual de TMP</i>	<i>71</i>
	<i>4.1.5.3 Ensaios de recuperação individual de TMP</i>	<i>72</i>
	<i>4.1.5.4 Curva analítica para SMX nas condições para análise simultânea.....</i>	<i>73</i>
	<i>4.1.5.5 Ensaios de recuperação individual de SMX</i>	<i>74</i>

4.1.6	<i>Estudo da precisão</i>	75
4.1.7	<i>Curva analítica para determinação simultânea de SMX e TMP</i>	76
4.1.8	<i>Ensaio de recuperação simultânea de SMX e TMP</i>	77
4.1.9	<i>Análise de Amostras Reais</i>	78
4.1.9.1	Interferentes	78
4.1.9.2	Determinação voltamétrica simultânea de SMX e TMP em amostras reais	79
4.2	Associação Ácido Kójico e Hidroquinona	82
4.2.1	<i>Comportamento voltamétrico do ácido kójico sobre ECV</i>	82
4.2.2	<i>Comportamento voltamétrico da hidroquinona sobre ECV</i>	83
4.2.3	<i>Influência do pH na resposta voltamétrica do AK e HQ</i>	85
4.2.4	<i>Determinação individual de Ácido kójico</i>	87
4.2.4.1	Otimização dos parâmetros da VOQ para determinação de AK	87
4.2.4.2	Curva analítica otimizada para determinação de AK	89
4.2.4.3	Ensaio de recuperação individual de AK	89
4.2.5	<i>Determinação individual de HQ e obtenção das condições otimizadas para análise simultânea dos clareadores</i>	90
4.2.5.1	Otimização dos parâmetros instrumentais da VOQ	90
4.2.5.2	Curva analítica para determinação individual de HQ	92
4.2.5.3	Ensaio de recuperação individual de HQ	93
4.2.5.4	Curva analítica para AK nas condições para análise simultânea	94
4.2.6	<i>Curva analítica para determinação simultânea de AK e HQ</i>	95
4.2.7	<i>Ensaio de recuperação simultânea de AK e HQ</i>	96
4.2.8	<i>Validação do método voltamétrico para determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona</i>	97
4.2.8.1	Exatidão	97
4.2.8.2	Especificidade	99
4.2.8.2.1	Ácido Ascórbico	99
4.2.8.2.2	Metabissulfito de sódio	99
4.2.8.3	Linearidade e Intervalo	102
4.2.8.4	Limite de Detecção e Quantificação	103
4.2.8.5	Precisão	103
4.2.10	<i>Análise de amostras reais</i>	105

5. CONCLUSÕES.....	108
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

O controle de qualidade de medicamentos é um dos mais importantes ramos de aplicação da química analítica, pois tem grande impacto na saúde pública. A necessidade de se monitorar de forma contínua a produção de fármacos justifica-se pela importância inerente ao tema. Considerando que os medicamentos são destinados a tratar pessoas já debilitadas por alguma doença ou sintoma particular, garantir a qualidade do produto e fornecer maior segurança aos seus usuários, é primordial.

De modo geral, grande parte das propostas analíticas para este fim envolve a utilização de técnicas instrumentais modernas, muitas vezes onerosas, com longo tempo de análise e grande geração de resíduos. Portanto, a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e de baixo custo, que permitam monitorar de forma eficiente a produção de medicamentos, com redução dos impactos ao meio ambiente, é de evidente relevância.

Dentro deste contexto, e em função da seriedade que este tipo de análise reveste, as técnicas voltamétricas têm-se mostrado atrativas para a determinação de fármacos eletroativos em diferentes matrizes. Fato este relacionado a características como, simplicidade analítica e instrumental, baixo custo e redução no tempo de análise quando comparada a outras técnicas viabilizando a implementação do método em análises de rotina. Outra vantagem dos métodos voltamétricos aplicados à análise farmacêutica está no fato de que a maioria dos excipientes não são eletroativos. Deste modo, estes métodos se destacam pela seletividade, uma vez que apenas componentes eletroativos podem ser oxidados ou reduzidos na superfície dos eletrodos, além do analito ser prontamente identificado através de seu potencial de oxidação/redução^[1].

1.1 Eletroanalítica

A eletroquímica sempre proporcionou técnicas analíticas caracterizadas pela simplicidade instrumental, custo moderado e portabilidade. A eletroanálise teve sua origem oito décadas atrás e pode ser classificada como uma área da eletroquímica voltada à identificação e/ou quantificação de substâncias químicas em diversos tipos de amostras^[1, 2]. Os métodos eletroanalíticos envolvem a medida de alguma propriedade elétrica (potencial, corrente, resistência e carga elétrica^[3]) que se correlacione com a concentração de uma

espécie de interesse.

As técnicas eletroanalíticas podem ser facilmente adotadas para resolver muitos problemas de interesse farmacêutico, com aceitável exatidão, precisão, sensibilidade e seletividade e muitas vezes com boa reprodutibilidade^[4]. Entre as técnicas eletroanalíticas amplamente utilizadas, maior destaque deve ser dado às técnicas voltamétricas, as quais tem se mostrado uma excelente alternativa para determinação de inúmeras moléculas orgânicas, incluindo fármacos e metabólitos em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos^[4].

O campo da voltametria desenvolveu-se a partir da polarografia, um tipo de voltametria que foi descoberto pelo químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky no início dos anos 1920, sendo que a polarografia difere de outros tipos de voltametria porque, nesse caso, um eletrodo de mercúrio é empregado como eletrodo de trabalho^[3].

Os métodos voltamétricos fundamentam-se nos fenômenos que acontecem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada de solução adjacente a essa superfície. A técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada com fluxo de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial^[5]. Desta forma, as informações sobre o analito são obtidas por meio da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar quando se aplica uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. A corrente gerada por oxirredução de espécies eletroativas na interação do analito com o eletrodo é a faradaica (obedece a lei de Faraday), sendo portanto proporcional à concentração^[5].

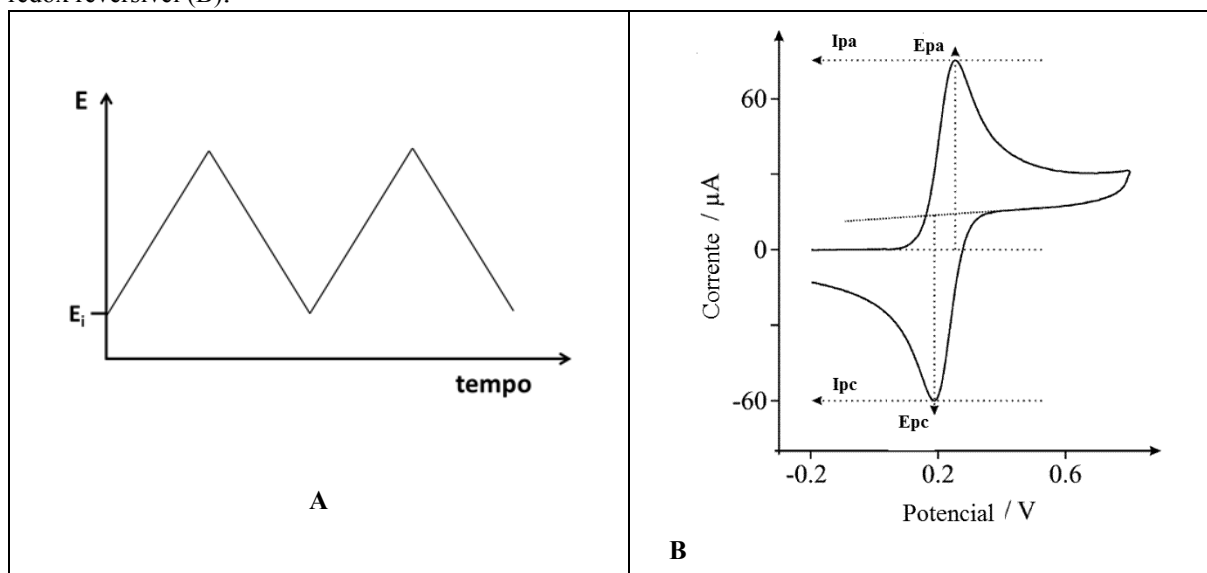
O avanço nas técnicas voltamétricas no campo de análises de fármacos está relacionado à sua simplicidade e principalmente por ser menos sensível aos efeitos da matriz em comparação com outras técnicas analíticas^[6]. Um dos grandes benefícios da voltametria está na possibilidade da medida ser realizada diretamente na amostra, sem a precisão de etapas de pré-purificações ou de separações prévias, permitindo a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas^[7]. Além disso, a determinação simultânea e rápida de uma mistura de substâncias pode ser conseguida, com elevada sensibilidade e baixo custo^[8]. Atualmente, existem diversas técnicas voltamétricas que são utilizadas para fins analíticos qualitativos e quantitativos, como exemplo, pode-se citar a voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ).

1.1.1 Voltametria Cíclica

Em meio aos vários métodos disponíveis para estudo de processos eletródicos, a voltametria cíclica é, provavelmente, a técnica mais útil para obter informações sobre as reações eletroquímicas^[9]. Dentre as informações fornecidas destaca-se a termodinâmica de processos redox, a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e dados sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos^[10]. Frequentemente, a voltametria cíclica é a primeira técnica realizada em estudos eletroanalíticos, pois oferece uma rápida localização dos potenciais dos processos redox de espécies eletroativas, e uma avaliação adequada do efeito do meio sobre o processo^[10], deste modo, a técnica popularizou-se para estudos eletroquímicos iniciais de novos sistemas e provou sua utilidade na obtenção de informações sobre reações bastante complicadas^[11].

Na voltametria cíclica o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário (em uma solução sem agitação). Varia-se o potencial de forma linear alternando entre crescente e decrescente frente ao eletrodo de referência, ou seja, a onda triangular produz a varredura no sentido direto e depois no sentido inverso (Figura 01A), dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados^[5, 3]. A Figura 01B mostra um voltamograma cíclico típico de um processo redox reversível, resultante da corrente em função do potencial.

Figura 01: Aplicação do potencial na voltametria cíclica (A) e voltamograma cíclico típico para um processo redox reversível (B).



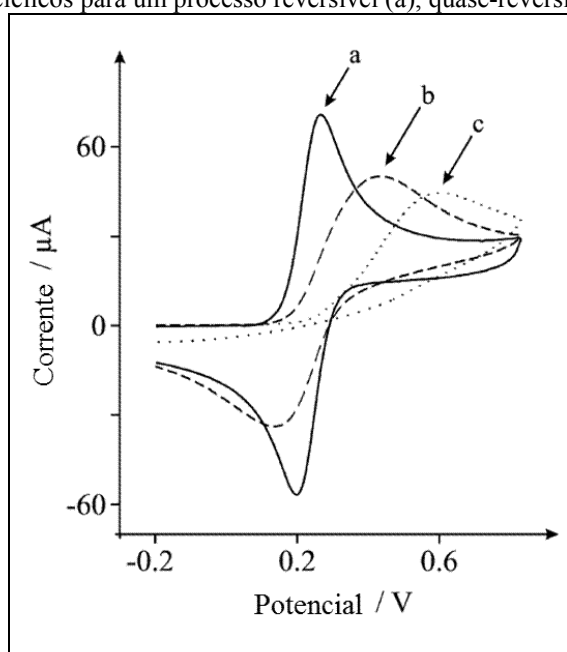
Fonte: (A) Adaptado de [5] e (B) Adaptado de [12].

Os parâmetros mais importantes que podem ser obtidos a partir de um voltamograma

cíclico são: potencial de pico anódico (E_{pa}), potencial de pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódico (I_{pa}), corrente de pico catódico (I_{pc}) e a diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico (ΔE_p).

O processo envolvido na voltametria cíclica pode ser reversível, quase-reversível ou irreversível e o tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em estudo sofre no eletrodo (Figura 02), o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos^[5].

Figura 02: Voltamogramas cíclicos para um processo reversível (a), quase-reversível (b) e irreversível (c).



Fonte: Adaptado de [12].

Em sistemas reversíveis (Figura 02 – voltamograma (a)), ou seja, reações que ocorrem com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo, as varreduras na direção catódica e anódica originam picos de corrente regidos pela equação Randles-Sevcik (1):

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

Onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (cm^2), C é concentração (mol cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). Portanto, a corrente é diretamente proporcional à concentração e aumenta com a raiz quadrada da velocidade de varredura^[10].

Para processos reversíveis a razão entre as correntes de pico anódica e catódica (I_{pa}/I_{pc}) é igual a uma unidade e independe da velocidade de varredura^[5, 13]. A separação entre os potenciais de pico pode ser empregada para determinar o número de elétrons, bem como o comportamento nernstiano do sistema, é dada por (2):

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} V \quad (2)$$

Teoricamente, a diferença de potencial (ΔE_p) entre os picos de oxidação e redução é de 59 mV para reações reversíveis com um elétron. Ambos os potenciais de pico, anódico e catódico são independentes da velocidade de varredura^[10, 14].

Em sistemas totalmente irreversíveis costuma-se observar apenas o pico anódico (Figura 02 – voltamograma (c)), este processos são caracterizados pelo deslocamento do potencial de pico com velocidade de varredura. Nessas condições, a corrente é afetada pelo coeficiente de transferência de carga e a equação (3) que descreve a corrente de pico é dada por^[10]:

$$I_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (3)$$

Onde n é o número de elétrons, α é o coeficiente de transferência de carga, A é a área do eletrodo (cm^2), C é concentração (mol cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

1.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial

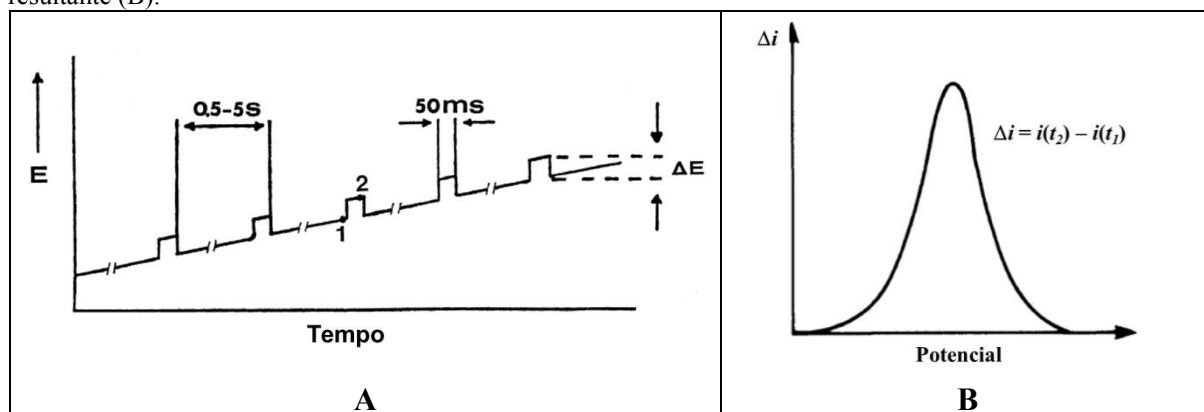
As técnicas de pulso são baseadas na medida da corrente elétrica em função do tempo de aplicação de um determinado pulso de potencial, as características da corrente medida relacionam-se com a largura do pulso e o degrau de potencial que é aplicado no eletrodo para promover o processo faradaico^[7]. Inicialmente, tais técnicas foram desenvolvidas como forma de sincronizar os pulsos aplicados com a formação e desprendimento das gotas em sistemas polarográficos, reduzindo, desta forma, a contribuição da corrente capacitiva por ocasião da amostragem de corrente ao final do tempo de vida da gota. Após a aplicação dos pulsos de potencial a corrente capacitiva diminui mais rapidamente que a componente faradaica, sendo o sinal analítico mensurado ao final da

aplicação^[5].

Nas técnicas de pulso, a perturbação do potencial do eletrodo não é uma função linear do tempo do experimento, pois a variação de potencial segue uma sequência de pulsos de potenciais, cujas respostas de corrente dependem da forma de aplicação dos pulsos de potenciais. A diferença na maneira de aplicá-los é que define as características de cada uma destas técnicas^[7].

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho (Figura 03A). A corrente é amostrada duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (em 1) e novamente ao final do pulso (depois ~40ms, em 2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes [$\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$] é plotada *versus* o potencial aplicado^[10]. O voltamograma de pulso diferencial resultante consiste na forma de uma curva gaussiana, cuja área é diretamente proporcional à concentração do analito (Figura 03B).

Figura 03: Sinal de excitação para a voltametria de pulso diferencial (A) e voltamograma de pulso diferencial resultante (B).



Fonte: Adaptados de (A) [10] e (B) [9].

A minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido, possibilitada pelo modo de pulso diferencial (pois a corrente capacitiva não depende da concentração da espécie em estudo), permite a obtenção de baixos limites de detecção^[5, 7].

1.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

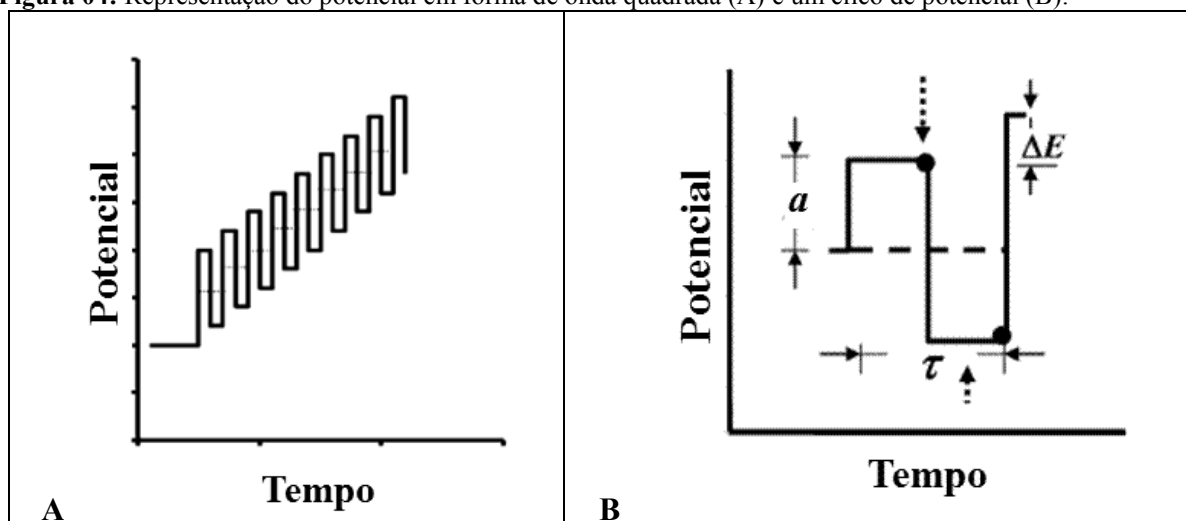
A voltametria de onda quadrada está entre as técnicas voltamétricas de pulso mais sensíveis para determinação direta de concentração, e tem sido amplamente utilizada para a análise de compostos farmacêuticos, pois apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição a correntes capacitivas em função da forma de aplicação do potencial^[7, 4].

Em um contexto histórico, a voltametria de onda quadrada origina-se do Kalousek *commutator* e da polarografia de onda quadrada de Barker^[15]. Com o progresso da tecnologia analógica e digital, nos anos 80 os estudos realizados por Osteryoung puderam ser incorporados aos polarógrafos, o que permitiu chegar ao modelo atual da voltametria de onda quadrada, onde a forma de varredura é rápida^[7].

A modulação de potencial utilizada na VOQ consiste em uma rampa de potencial em forma de escada com pulsos de potenciais em forma de onda quadrada (Figura 04A). Em cada degrau, dois pulsos de potencial iguais em altura e opostamente direcionados são impostos. Os dois últimos pulsos de potencial completam um único ciclo de potencial (Figura 04B). O ciclo de potencial é repetido em cada etapa, no decorrer da medida voltamétrica^[15]. Por razões históricas, a altura de um único impulso de potencial é denominada amplitude (a). O período é a duração de um ciclo de potencial (τ), a duração de cada pulso corresponde a metade do período ($\tau/2$) e a frequência de aplicação dos pulsos (f) é o inverso do período: $1/\tau$. O incremento de potencial (ΔEs) é a altura da escada em forma de onda^[16].

Na voltametria de onda quadrada a velocidade efetiva é dada pelo produto da frequência (f) pelo incremento de varredura de potencial (ΔEs), frequências de 1 a 100 ciclos por segundo permitem o uso de altas velocidade de varredura de potencial, onde um voltamograma pode ser recordado dentro de poucos segundos^[15, 10].

Figura 04: Representação do potencial em forma de onda quadrada (A) e um ciclo de potencial (B).



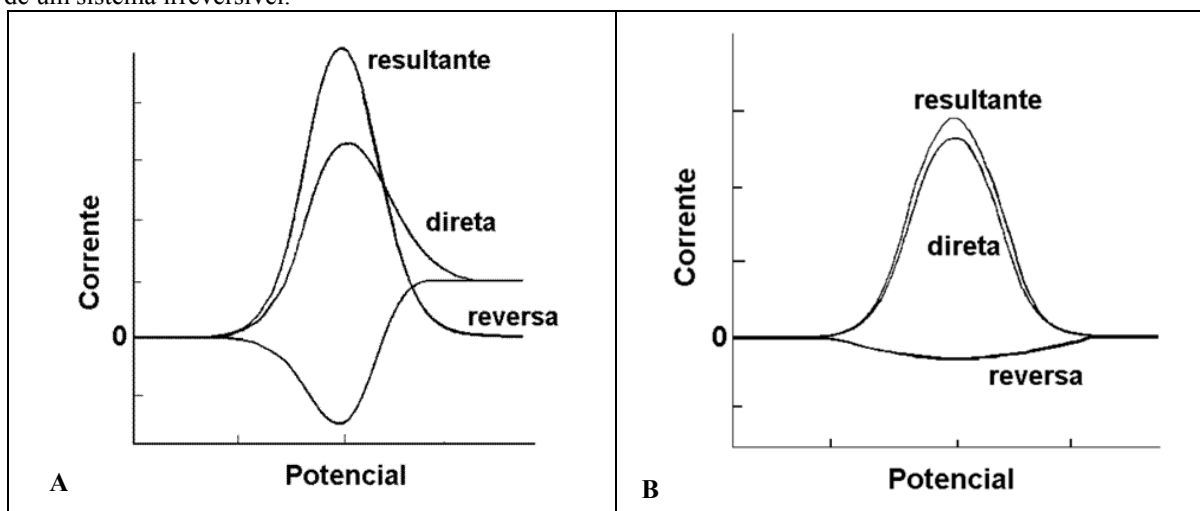
Fonte: Adaptados de [15].

A amostragem de corrente é feita duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outro ao final do pulso reverso, onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura, esta dupla amostragem garante uma

minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida^[5]. Consequentemente, em cada etapa, dois valores de corrente são obtidos, o voltamograma resultante consiste na diferença das correntes direta e reversa ($\Delta I = I_{direta} - I_{reversa}$) *versus* a rampa de potencial aplicado. O voltamograma de onda quadrada é comumente uma curva em forma de sino que permite determinar com precisão a sua posição e altura, onde há o máximo de corrente é chamado corrente de pico (I_p) e o potencial correspondente é o potencial de pico (E_p)^[16, 17].

A Figura 05 apresenta os voltamogramas teóricos associados a um sistema reversível (A) e um sistema irreversível (B), com a separação observada das correntes direta, inversa e resultante, com perfis voltamétricos semelhantes aos que eram obtidos na polarografia de onda quadrada^[7].

Figura 05: Voltamogramas de onda quadrada (A) processo redox de um sistema reversível e (B) processo redox de um sistema irreversível.



Fonte: [7].

Atualmente, a voltametria de onda quadrada é considerada como uma das técnicas voltamétricas mais avançadas que unifica as vantagens de técnicas de pulso, voltametria cíclica e técnicas de impedância^[15]. Dentre as suas várias vantagens, podemos enfatizar a maior rapidez na resposta, o que diminui o tempo de análise quando comparadas as outras técnicas voltamétricas e a possibilidade de obtenção de baixos limites de detecção e quantificação, em muitos casos, comparáveis aos obtidos por técnicas cromatográficas^[4].

1.1.3.1 Aplicações em Análises Farmacêuticas

As técnicas voltamétricas, especialmente a voltametria de onda quadrada, tem sido

amplamente explorada no desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação individual e/ou simultânea de uma grande variedade de compostos de interesse farmacêutico em função de sua rapidez, sensibilidade, precisão, exatidão e simplicidade^[18].

Deroco e colaboradores^[19], por exemplo, empregaram a voltametria de onda quadrada e um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinar o antimalárico, hidroxicloroquina (HCQ) em formulações farmacêutica e amostras de urina sintética. Através da voltametria cíclica foi possível constatar que a oxidação de HCQ é um processo controlado por difusão, o qual envolve um elétron. A curva analítica obtida ($I_{pa}/\mu A = 0,033 + 1,24 [HCQ/(\mu mol L^{-1})]$) para determinação HCQ (em $0,1 mol L^{-1}$ de H_2SO_4 como eletrólito suporte) apresentou resposta linear de $0,1$ a $1,9 \mu mol L^{-1}$, com limite de detecção de $0,06 \mu mol L^{-1}$. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de HCQ em amostras farmacêuticas (comprimidos), e os resultados não apresentam diferenças significativas, com 95% de confiança, quando comparados aos obtidos utilizando o método espectrofotométrico de referência.

Tajik e colaboradores^[20], por sua vez, utilizaram um eletrodo de pasta de carbono modificado com 5-amino-2'-etil-bifenil-2-ol e nanotubos de carbono associado a voltametria de onda quadrada para determinar o anti-hipertensivo, metildopa (MD) isoladamente e em associação com outro anti-hipertensivo, a hidroclorotiazida (HCT). Os resultados voltamétricos mostraram picos anódicos bem definidos nos potenciais de 275 e 660 mV (vs, Ag/AgCl) correspondente à oxidação de MD e HCT, respectivamente. Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos em tampão fosfato (pH=8), com $a = 0,01995V$, $f = 10 s^{-1}$ e $\Delta E_s = 0,0105V$. Para determinação simultânea, curvas analíticas foram construídas no intervalo de 5 a $190 \mu mol L^{-1}$ para MD e de 10 a $1200 \mu mol L^{-1}$ para HCT. Finalmente, o método desenvolvido foi aplicado com sucesso na determinação simultânea dos fármacos em amostras reais, farmacêuticas e de urina.

Já Dantas e colaboradores^[21], empregaram a voltametria de onda quadrada para determinar um antifúngico, o cetoconazol (CZT) em formulações farmacêuticas, utilizando um eletrodo sólido de amálgama de prata. As melhores respostas foram obtidas em tampão Britton-Robinson (BR), pH 12, com frequência de $100 s^{-1}$, amplitude de 25 mV e incremento de 2 mV. Sob estas condições, a CTZ apresentou um pico de redução bem definido e quase-reversível em -1,46 V. A curva analítica obtida foi linear na faixa de concentração de $4,97 \times 10^{-7}$ a $4,30 \times 10^{-6} mol L^{-1}$ com um coeficiente de correlação de 0,9989. Os limites de detecção e quantificação foram de 61,1 e 204,1 $\mu g L^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi utilizado na determinação do analito em amostras reais (xampu, comprimido e creme) com bons

resultados, sendo que as taxas de recuperação ficaram entre 90,84% - 104,9%, com desvios inferiores a 9,20%.

Outro exemplo é o de Eisele e colaboradores^[18] que desenvolveram um método eletroanalítico para a determinação simultânea dos fármacos: paracetamol (PAR), cafeína (CAF), e orfenadrina (ORF), utilizando a voltametria de onda quadrada e eletrodo de diamante dopado com boro. Em solução e H_2SO_4 0,5 M e parâmetros otimizados ($\alpha=30$ mV, $f=30$ s⁻¹ e $\Delta E_s=2$ mV), o método apresentou respostas lineares para PAR, CAF, e ORF nas faixas de concentração de $5,4 \times 10^{-7}$ a $6,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, $7,8 \times 10^{-7}$ a $3,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $7,8 \times 10^{-7}$ a $3,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e com limites de detecção de $2,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, $9,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $8,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação simultânea destes analitos em formulações farmacêuticas.

Por sua vez, Jain e Vikas^[22] determinaram o antibiótico cefpiroma, utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e voltametria de onda quadrada. Observou-se uma relação linear entre a corrente pico catódica e concentração de cefpiroma no intervalo de 100 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9955 em tampão BR pH 4,51. Os limites de detecção e quantificação foram $0,647 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,159 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método desenvolvido mostrou-se rápido e foi aplicado com sucesso na determinação do fármaco em solução e formulações farmacêuticas, com taxas de recuperação próximas a 100% e desvio Padrão Relativo (DPRs) inferiores a 1,5%.

Muitos outros exemplos de aplicação em análises farmacêuticas poderiam ser citados, visto a crescente utilização da VOQ na determinação sensível de muitos compostos farmacêuticos em diferentes matrizes. O avanço crescente da técnica pode ser explicado pelo fato de muitos dos constituintes ativos de formulações, em contraste com os excipientes, poderem ser facilmente oxidados e prontamente identificados pelo seu potencial de pico voltamétrico, conferindo grande seletividade a técnica. A possibilidade de utilização de vários tipos de eletrodos, como exemplos, os de mercúrio, os sólidos, ou ainda os modificados para desenvolvimento de métodos analíticos tem aumentado nos últimos anos devido à sua ampla aplicabilidade para a determinação de inúmeros compostos eletroativos de reconhecida importância farmacológica, o que é uma questão de grande relevância na área de análises clínicas e farmacêutica^[1].

1.2 Eletrodo de Carbono vítreo

Os materiais constituídos em sua essência por átomos de carbono ocupam uma

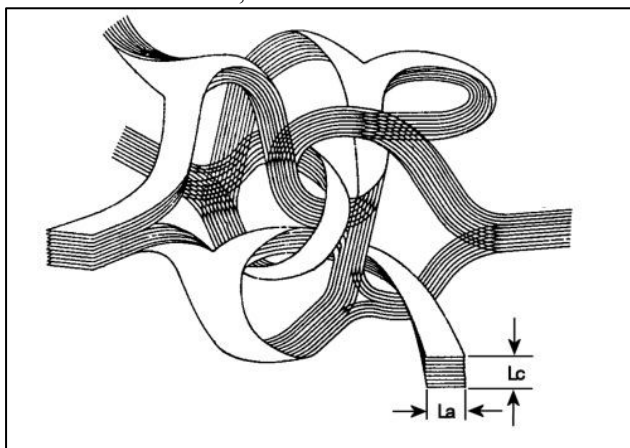
posição privilegiada, isto se deve ao fato deste elemento se ligar indefinidamente, podendo assumir combinações estruturais variadas, mediante o processo de produção utilizado^[23].

Desde a aplicação histórica por *Sir* Humphrey Davy de eletrodos de grafite para a produção eletroquímica de metais alcalinos, materiais de carbono têm sido amplamente utilizados na eletroquímica analítica e industrial. As várias vantagens dos eletrodos à base de carbono incluem o baixo custo, janela de potencial adequada, relativa estabilidade eletroquímica, e atividade eletrocatalítica para uma variedade de reações redox; em particular às oxidações e reduções de moléculas orgânicas e biológicas tanto em meios aquosos e não aquosos, para os quais as propriedades dos eletrodos de carbono são muitas vezes superiores aos dos metais nobres^[2, 24].

Em meio aos vários materiais de carbono disponíveis, o carbono vítreo é amplamente investigado para aplicações eletroquímicas^[2]. Ele pode ser obtido através do tratamento térmico de um polímero, frequentemente a poliacrilonitrila, o qual é aquecido a 1000-3000°C sob pressão, em uma atmosfera inerte. Nestas condições, os heteroátomos são evaporados até que apenas o carbono permaneça, pois as ligações C-C não são rompidas a esta temperatura^[24]. O nome vítreo deve-se ao aspecto brilhante que o material adquire quando recebe polimento e também pela sua fratura conchoidal^[2].

O modelo estrutural proposto por Jenkins e Kawamura^[25] (Figura 06) é o mais simplificado e bastante aceito para explicar as características do carbono vítreo. O carbono vítreo é, estruturalmente, um carbono sp^2 , e possui uma estrutura de planos de carbono que se assemelha a fitas entrelaçadas, apresentando ordenação bidirecional desses planos e arranjo ao acaso na terceira direção, esta estrutura é responsável pela sua característica amorfa, isotrópica e possível falta de homogeneidade^[8, 23].

Figura 06: Estrutura do carbono vítreo, onde L_a e L_c são as dimensões das fibrilas gráficas.



Fonte: [26].

O carbono vítreo tem sido amplamente utilizado como material para obtenção de eletrodos, devido às suas excelentes propriedades elétricas e mecânicas, bem como, ampla janela de potencial, extrema inércia química, sendo altamente resistente ao ataque ácido, impermeável a gases e tem um desempenho relativamente reprodutível.

Embora o eletrodo de carbono vítreo (ECV) possua desempenho bastante satisfatório, desvantagens relacionadas à passivação do eletrodo, causada pela adsorção de substâncias ativas, matrizes orgânicas e etc. à superfície, devem ser evitadas ou minimizadas, a fim de garantir a estabilidade da resposta^[27, 28]. Alguns procedimentos, tais como, o polimento em alumina ou pasta de diamante (0,05-1,0 μm) sobre um pano de polimento, seguido pela lavagem com água ultrapura ou o pré-tratamento eletroquímico da superfície com ciclos entre 1,0 e -1,0 V podem ser empregados para criar uma superfície ativa e reprodutível, melhorando o desempenho analítico destes eletrodos^[8].

1.2.1 Eletrodo de Carbono Vítreo na Análise Farmacêutica

Em função das características anteriormente citadas, os eletrodos de carbono vítreo (ECV) são frequentemente empregados na eletroanálise de vários compostos farmacêuticos em formulações e/ou em fluidos biológicos, no estudo do mecanismo de oxirredução eletroquímica e/ou quantificação^[8].

Jain e colaboradores^[29], por exemplo, utilizaram um eletrodo de carbono vítreo no desenvolvimento e validação de um método para quantificação voltamétrica de nitazoxanida (anti-helmíntico antiparasitário, utilizado no tratamento de infecções intestinais) em formulações farmacêuticas. Os voltamogramas cíclicos, em tampão BR, pH 3, revelaram a presença de único pico de redução irreversível em -0,75 V vs. Ag/AgCl. Nas condições otimizadas ($\alpha=50$ mV, $f=70$ s⁻¹ e $\Delta E_s=10$ mV), a corrente de pico foi linear em relação à concentração do fármaco na faixa de 20-140 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,9938. Os limites de detecção e quantificação calculados foram 5,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 17,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi validado sob os parâmetros: especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e posteriormente aplicado na determinação de nitazoxanida em comprimidos.

Já Buoro e colaboradores^[30] empregaram um ECV para avaliar a eletro-oxidação de sulfassalazina (SSZ), um composto farmacêutico utilizado no tratamento de artrite reumatoide. A oxidação eletroquímica do SSZ foi estudada por voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, em uma ampla faixa de pH.

Em eletrólitos com $\text{pH} < 11,0$, a oxidação de SSZ é irreversível, controlada por difusão das espécies e dependente do pH, envolvendo a transferência de um elétron e de um próton da hidroxila do grupo salicílico; enquanto que, para $\text{pH} > 11,0$ a oxidação é independente do pH, com um $\text{pK}_a \sim 11$. Observou-se a formação de um produto de oxidação tipo quinona envolvendo dois elétrons e dois prótons em uma reação redox reversível. De acordo com as observações, foi proposto um mecanismo de oxidação eletroquímica para o composto em estudo. A determinação eletroanalítica de SSZ foi realizada em tampão fosfato, pH 7, na faixa de concentração de $10,0$ a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, os limites de detecção e quantificação calculados foram $3,43 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $11,39 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, assim o ECV pode ser aplicado para determinação rápida de SSZ em comprimidos em análises de rotina.

Braga e colaboradores^[31], por sua vez, quantificaram o antibacteriano sulfadiazina, em duas amostras de produtos farmacêuticos, utilizando a voltametria de onda quadrada e um eletrodo de carbono vítreo. O sinal analítico foi obtido através pico de redução irreversível da sulfadiazina, observado em $-1,49 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. A determinação eletroanalítica foi realizada em tampão BR (pH 6,8), sendo a curva analítica construída na faixa de concentração de $62,7$ a $340,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($R = 0,9986$), com limite de detecção de $10,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. As taxas de recuperação ficaram entre $94,9$ e $101,1\%$ para uma das amostras analisadas, e entre $96,0$ e $104,6\%$ para a outra, indicando que a composição da matriz não interfere nos resultados analíticos. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação do fármaco em duas amostras de produtos farmacêuticos, com DPRs inferiores a 2% . Os resultados obtidos através do método voltamétrico foram comparados ao método padrão de titulação amperométrica e comprovou-se que não há diferença significativa em um nível de confiança de 95% .

Outro exemplo é apresentado por Bagheri e Hosseini^[32], o quais, empregaram um ECV no estudo eletroquímico e quantificação de raloxifeno (RLX), utilizado na prevenção da osteoporose e também para a redução do risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa. Os estudos de voltametria cíclica foram realizados em vários eletrólitos suporte, em amplas faixas de pH e velocidades de varredura. Os estudos mostraram a presença de um processo de oxidação quase-reversível, com picos de oxidação em $+0,827 \text{ V}$ e redução em $-0,720 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, envolvendo a transferência de dois prótons e dois elétrons e controlado por adsorção. Sob condições otimizadas, a voltametria de pulso diferencial (DPV) foi aplicada para a determinação quantitativa do RLX em tampão fosfato (pH=3). A corrente foi linear com a concentração do fármaco na faixa de $0,2$ - $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de $0,0750 \mu\text{mol L}^{-1}$, DPR inferior a $3,0\%$ e boa sensibilidade. O método proposto foi aplicado com sucesso para a determinação de RLX em amostras farmacêuticas e plasma humano com

uma boa seletividade e taxas de recuperação.

Em função dos vários exemplos reportados na literatura, observa-se que a aplicação do eletrodo de carbono vítreo constitui uma excelente opção para desenvolvimento de métodos voltamétricos simples, orientados a determinação de fármacos.

1.3 Associações Farmacêuticas e Cosméticas

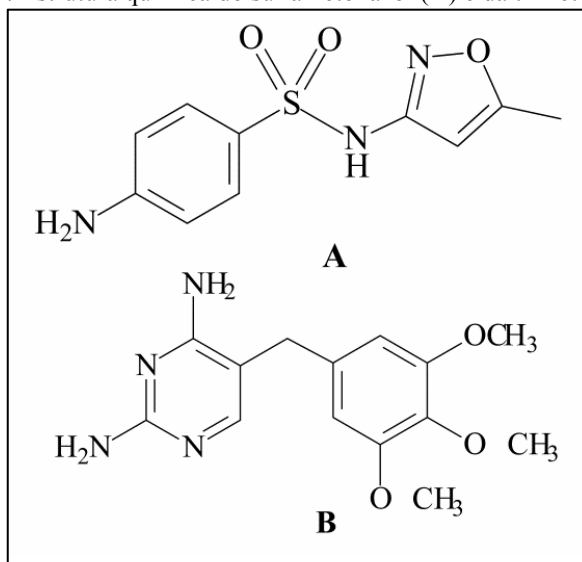
A associação é uma combinação de princípios ativos em uma determinada dose, o termo pode ser utilizado para designar uma associação específica de princípios ativos independentemente da formulação ou os princípios ativos em uma mesma forma farmacêutica. É possível ocorrer *aditismo*, em que o efeito combinado de fármacos A e B é igual à soma aritmética dos efeitos dos fármacos individuais, $A + B$, nas doses escolhidas, ou, *sinergismo* quando a ação simultânea de dois fármacos resulta em um efeito superior ao que podia ser esperado com a simples adição dos efeitos individuais dos fármacos^[33].

1.3.1 Sulfametoxazol e Trimetoprima

As sulfonamidas pertencem ao grupo de drogas anti-bacterianas frequentemente prescritas para o tratamento de muitas doenças infecciosas humanas e animais, devido ao baixo custo e alta eficiência no tratamento de várias doenças bacterianas^[34]. O mecanismo de ação das sulfonamidas consiste na competição, em função da semelhança estrutural, com ácido para-aminobenzoico (PABA), produto intermediário na produção do ácido fólico, necessário para o crescimento das bactérias^[35].

O sulfametoxazol (SMX) (Figura 07A), ou 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida é uma das sulfas mais eficazes no tratamento de infecções urinárias, por ter lenta absorção e excreção no organismo humano, no entanto, apresenta maior tendência a produzir níveis sanguíneos excessivos e causar cristalúria (formação de cristais na urina). Algumas combinações farmacêuticas de sulfonamidas são comercializadas com o propósito de reduzir a incidência de cristalúria^[36]. Uma boa associação é a do sulfametoxazol com a trimetoprima.

A trimetoprima (TMP) (Figura 07B) (5-[(3,4,5-trimetoxifenil) metil]-2,4-pirimidinodiamina) é o derivado das diaminopirimidinas mais usado e estudado como aditivo antibacteriano. Estes derivados inibem a conversão do ácido diidrofolico ao ácido tetrahidrofolico, necessário para a síntese de ácidos nucleicos nas bactérias^[37].

Figura 07: Estrutura química do sulfametoxazol (A) e da trimetoprima (B).

Fonte: A autora.

Alguns parâmetros físico-químicos do sulfametoxazol e da trimetoprima são apresentados na tabela 01.

Tabela 01: Parâmetros físico-químicos do sulfametoxazol e da trimetoprima.

<i>Propriedade</i>	<i>Sulfametoxazol</i>	<i>Trimetoprima</i>
Fórmula molecular	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Massa molar	253,28 g mol ⁻¹	290,32 g mol ⁻¹
Características físicas	Pó cristalino branco ou quase branco.	Pó cristalino, branco ou branco amarelado. Praticamente inodoro. Apresenta polimorfismo.
Faixa de fusão	168 °C a 172 °C	199 °C a 203 °C
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em acetona, ligeiramente solúvel em etanol, pouco solúvel em éter etílico. Facilmente solúvel em soluções diluídas de hidróxido de sódio.	Muito pouco solúvel em água, ligeiramente solúvel em clorofórmio e metanol, pouco solúvel em etanol e acetona e praticamente insolúvel em éter etílico e tetracloreto de carbono.
Constantes de dissociação	pKa ₁ = 1,6; pKa ₂ = 5,7	pKa= 7,3

Fonte: [38, 39, 40]

A associação do sulfametoxazol com trimetoprima tem efeito sinérgico, cuja combinação potencializa o efeito bacteriostático da sulfa, pois possui efeito inibidor em mais de uma etapa na sequência de reações enzimáticas obrigatórias nas bactérias. Por causa do mecanismo de ação da associação, o risco de resistência bacteriana é minimizado^[40]. Esta associação é amplamente utilizada no tratamento de diversas doenças, tais como, infecções do trato respiratório superior e inferior (ex. bronquite, faringite, sinusite e otite), do trato urinário e do sistema gastrointestinal^[41], deste modo, um rigoroso controle de qualidade na fabricação destes medicamentos é mais que necessário.

1.4.1.1 Métodos para Quantificação de Sulfametoxazol e Trimetoprima

De acordo com a farmacopeia americana (USP)^[42], o método oficial para análise simultânea de trimetoprima e sulfametoxazol em formulações farmacêuticas implica no uso da Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Muitos autores têm quantificado SMX e TMP em amostras farmacêuticas e biológicas por diversas técnicas, tais como, espectrofotometria UV-Vis^[41, 43, 44], cromatografia líquida com detector de arranjo de fotodiodos (PDA)^[45, 46], cromatografia líquida de fase reversa com detector espectrofotométrico^[47], eletroforese capilar^[48, 49, 50], dentre outras. Por outro lado, exemplos da determinação da associação utilizando-se métodos voltamétricos são pouco comuns. Existem reportados na literatura, alguns exemplos que utilizam eletrodo de mercúrio, de diamante dopado com boro e eletrodo composto (Tabela 02).

Tabela 02: Determinação voltamétrica da associação sulfametoxazol e trimetoprima.

Eletrodo	Eletrólito	Técnica	Faixa linear SMX/TMP	LQ SMX/TMP	LD SMX/TMP	Referência
Mercúrio	SMX - 0,1 mol L ⁻¹ HCl TMP - Tampão Acetato, pH 3,8	VPD	51,0 a 253,0 ng mL ⁻¹ / 28,8 a 432,5 ng mL ⁻¹	-	13,8 ng mL ⁻¹ / 10,5 ng mL ⁻¹	[37] ^a
Diamante dopado com boro (DDB)	Tampão BR, pH 7,0	VPD	1,0 a 10,0 mg L ⁻¹ / 0,2 a 2,0 mg L ⁻¹	12,2 µg L ⁻¹ / 13,1 µg L ⁻¹	3,65 µg L ⁻¹ / 3,92 µg L ⁻¹	[40] ^a
Diamante dopado com boro (DDB)	Tampão BR, pH 7,0	VPD	1,0 a 8,0 mg L ⁻¹ / 0,2 a 1,6 mg L ⁻¹	55,1 µg L ⁻¹ / 61,1 µg L ⁻¹	16,5 µg L ⁻¹ / 18,3 µg L ⁻¹	[51] ^a
Compósito	Tampão BR, pH 7,0	VPD	0,1 a 0,7 µmol L ⁻¹ / 0,1 a 0,7 µmol L ⁻¹	-	6,1 µg L ⁻¹ / 9,0 µg L ⁻¹	[52] ^b

^aDeterminação em amostras de medicamentos.^bDeterminação em amostras de águas naturais.

Fonte: A autora.

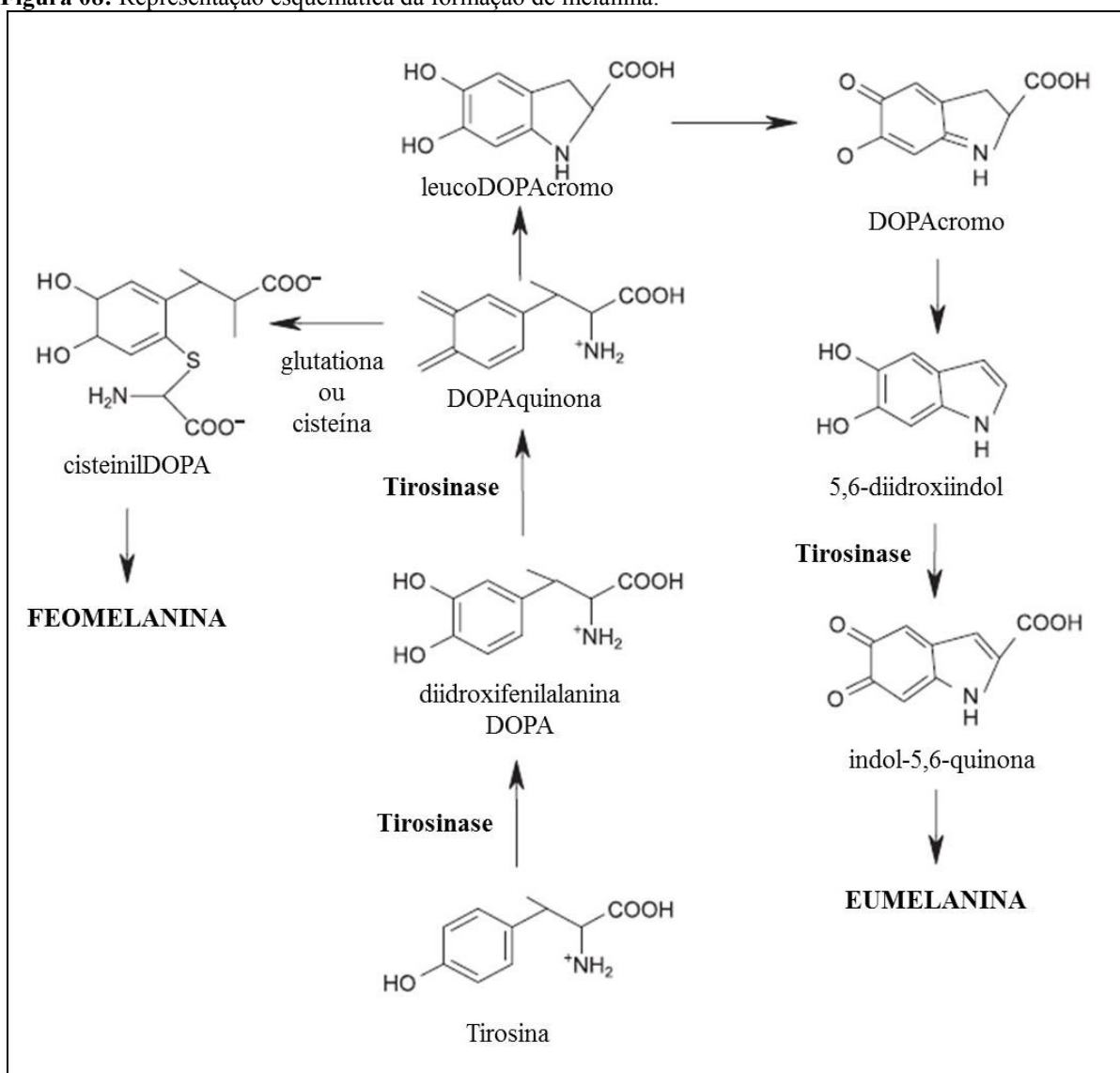
Do mesmo modo, a utilização do eletrodo de carbono vítreo associado à voltametria de onda quadrada para quantificação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em amostras farmacêuticas também pode proporcionar uma alternativa interessante do ponto de vista do baixo custo e robustez, o que poderia facilitar a implantação deste método em análises de rotina destes fármacos.

1.3.2 Ácido Kójico e Hidroquinona

A cor da pele humana decorre na camada mais externa da pele, a epiderme, onde as células produtoras de pigmentos estão localizadas para produzir o principal pigmento biológico envolvido na pigmentação cutânea e determinante das diferenças na coloração, a melanina^[53, 54].

A melanina é produzida nos melanócitos, onde dois tipos de melanina são sintetizadas: eumelanina (castanho-escuro) e feomelanina (amarelo-vermelho). A tirosinase catalisa as duas primeiras etapas da produção de melanina: a hidroxilação do aminoácido L-tirosina a 3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) e a oxidação do L-DOPA a o-dopaquinona^[53, 55], que após várias transformações, converte-se em melanina^[56] (Figura 08).

Figura 08: Representação esquemática da formação de melanina.



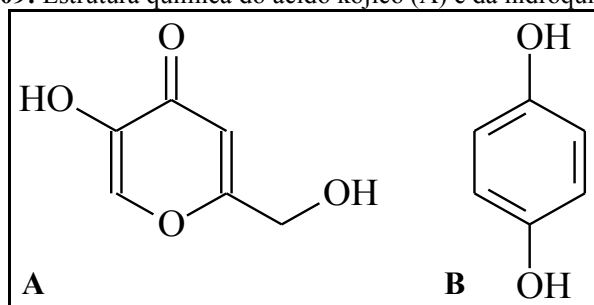
Fonte: Adaptado de [55].

Nos melanócitos, a melanina produzida fica armazenada em estruturas intracitoplasmáticas específicas, denominadas melanossomas. A melanina total da pele resulta de uma mistura de monômeros de feomelanina e eumelanina e a proporção entre as duas determina a expressão fenotípica final da cor^[54]. Distúrbios da pigmentação da pele devido ao excesso de melanina podem ter diferentes causas, tais como, exposição excessiva à radiação solar, envelhecimento, disfunções hormonais durante a gravidez ou o uso de certos medicamentos como anticoncepcionais, dentre outros^[57].

Diferentes compostos têm sido utilizados como agentes despigmentantes no tratamento das disfunções dermatológicas caracterizadas por alterações na pigmentação da pele. Entre os mais populares, estão o arbutin, ácido ascórbico, ácido azelaico, ácido retinóico, ácido fítico, ácido kójico e hidroquinona^[58]. A combinação de agentes despigmentantes costuma ser utilizada para aumentar sua eficácia em relação aos mesmos em separado, diminuindo a duração da terapia e reduzindo o risco de efeitos adversos^[59]. Em meio aos vários clareadores disponíveis no mercado, podemos destacar a associação: ácido kójico + hidroquinona.

O ácido kójico (AK) (Figura 09A) ou 5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona é uma substância natural produzida por vários fungos e bactérias, tais como, espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*^[60]. Dentre suas várias propriedades, a ação quelante de íons cobre e consequente inibição na formação de melanina, merece destaque, pois confere ao ácido kójico ação clareadora. A hidroquinona (HQ) (Figura 09B) ou 1,4-dihidroxibenzeno, por sua vez, tem uma variedade de aplicações, sendo que uma das principais está relacionada a sua propriedade despigmentante, por ser um hidroxifenol de estrutura química similar ao precursor da melanina, é há décadas utilizado como clareador^[61]. A HQ inibe a conversão da DOPA a melanina através da inibição da atividade da tirosinase, alguns outros mecanismos propostos são a inibição da síntese de DNA e RNA, degradação de melanossomas, e destruição de melanócitos pela supressão dos processos metabólicos^[62, 63].

Figura 09: Estrutura química do ácido kójico (A) e da hidroquinona (B).



Fonte: A autora.

Diversas formulações tópicas de clareadores, contendo hidroquinona em associação com ácido kójico, em diferentes concentrações, sob a forma creme ou gel, tem sido prescritas para tratar problemas de hiperpigmentação em tratamentos dermatológicos, tendo sua origem predominante em farmácias de manipulação, através da manipulação magistral^[64, 65]. A segurança e o controle de qualidade dos produtos manipulados é algo cada vez mais exigido pelas autoridades. No Brasil a RDC nº 67 de 8 de outubro de 2007 da ANVISA^[66] dispõe sobre: *Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias*, este regulamento técnico fixa os requisitos mínimos exigidos para o exercício das atividades de manipulação de preparações magistrais e oficiais das farmácias, o qual compreende desde instalações, equipamentos e recursos humanos, aquisição e controle da matéria-prima, armazenamento, avaliação da prescrição, manipulação, fracionamento, conservação, transporte, dispensação e atenção aos usuários, visando à garantia de qualidade e segurança dos produtos manipulados, uma vez que a farmácia é responsável pela qualidade das preparações magistrais e oficiais que manipula, conserva, dispensa e transporta. Assim, o controle de qualidade de todo o processo de manipulação, bem como do produto final tornam-se indispensáveis para garantir ao paciente um produto com qualidade, seguro e eficaz, assegurando que as preparações estejam dentro dos padrões mínimos exigidos^[66].

O uso de cosméticos que contenham hidroquinona é proibido na União Europeia e rigorosamente controlada nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA)^[67]. No entanto, devido a grande utilização, os produtos para clarear a pele deveriam ser controlado em todo o mundo, pelos próprios fabricantes, para assegurar que as formulações contenham a quantidade correta do princípio ativo, bem como, pelas autoridades, a fim de garantir a segurança do usuário^[57]. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de método conveniente para análises de rotina de ácido kójico e hidroquinona em dermocosméticos é altamente desejável, uma vez que vai garantir a eficácia e segurança deste tipo de produto.

1.4.2.1 Métodos para Quantificação de Ácido Kójico e/ou Hidroquinona

Nos últimos anos, há reportado na literatura, vários estudos utilizando métodos voltamétricos para determinação individual de ácido kójico ou hidroquinona em amostras de cosméticos, alguns exemplos são apresentados na Tabela 03.

Tabela 03: Exemplos de determinação voltamétrica individual de ácido kójico ou hidroquinona em cosméticos.

Eletrodo	Analito	Eletrólito	Técnica	Faixa linear	LD	Referência
Eletrodo de carbono impresso pré-anodizado	AK	Tampão BR, pH 10	VOQ	Acima de $2,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	[68]
Biossensor parafina/grafite modificado com tecido de batata-doce	HQ	Tampão fosfato, pH 7	Amperometria	$7,5 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$8,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	[69]
Eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo	HQ	Tampão fosfato, pH 7,5	VOQ	$6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	[70]
Eletrodo de carbono líquido iônico (HMIMPF ₆)	HQ	Tampão PBS, pH 7	VPD	$1,0 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	[71]
Sensor modificado com polímero de impressão molecular não-covalente (MIP)	AK	Tampão acetato, pH 5,2	VPD	$1,0 \times 10^{-8}$ a $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	$3,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$	[72]
Eletrodo de nanotubos de óxido de titânio com nanopartículas de ouro	HQ	Tampão fosfato, pH 7	VC	$1,0 \times 10^{-4}$ a $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	[73]
Eletrodo de nanotubo de carbono dopado com poli (3,4- etilenodioxitiofeno)	HQ	Tampão BR, pH 3,0	Amperometria	$1,1 \times 10^{-6}$ a $1,25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$0,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	[74]
Sensor baseado em microesferas híbridas CuO/Fe ₂ O ₃ imobilizadas em matriz quitosana	AK	Tampão PBS, pH 7	Amperometria	$0,2 \times 10^{-6}$ a $6,74 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$0,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	[75]
Eletrodo de carbono impresso	HQ	Tampão fosfato, pH 2	VOQ	$1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$23,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	[76]

Fonte: A autora.

Com relação à determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona em amostras de cosméticos, diferentes métodos analíticos têm sido propostos, estes incluem técnicas, tais como, cromatografia líquida^[77, 78, 79], cromatografia gasosa^[57, 80], cromatografia eletrocínica capilar micelar^[81], espectrofotometria UV-Vis^[64] e eletroforese capilar^[82]. Entretanto, até o presente momento, não há reportado na literatura exemplos para a quantificação simultânea destes compostos utilizando-se métodos voltamétricos.

A possível utilização de métodos eletroanalíticos neste tipo de análise é uma alternativa atraente a ser investigada, uma vez que conduziria a uma simplificação do processo analítico e diminuição no tempo de análise.

1.4 Quimiometria

Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade^[83]. A quimiometria é uma área da química que envolve a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos, (a) para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada, e (b) para fornecer o máximo de informações químicas relevantes pela análise dos dados obtidos^[84].

Dentre às várias subáreas da quimiometria, podemos destacar o reconhecimento de padrões, onde a partir de uma vasta gama de informações sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras que são similares entre si e, assim, detectar tendências nos dados; a calibração multivariada em que se busca estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas realizadas em amostras com uma determinada propriedade de interesse; e o planejamento de experimentos, onde se busca encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas^[85].

1.4.1 Planejamento e Otimização de Experimentos

Em qualquer área de pesquisa é interessante conhecer quais são as variáveis (ou fatores) que afetam o sistema em estudo e a extensão desta influência, a fim de melhorar o processo de uma maneira geral, com o objetivo de reduzir tempo e custos. Basicamente, o método multivariado consiste em estabelecer e conduzir o menor número de experimentos necessários para extrair o máximo de informação dos dados coletados de modo a avaliar e/ou otimizar um processo^[86].

Desta forma, é possível empregar planejamentos experimentais baseados em

princípios estatísticos, para extrair de um sistema em estudo o máximo de informação útil, com um número mínimo de experimentos. Para tal, é necessário decidir quais são os fatores (qualitativos ou quantitativos) e as respostas de interesse. Os fatores em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar, enquanto as respostas são as variáveis de saída do sistema, as quais se deseja otimizar, e que serão (ou não) afetadas por modificações provocadas nos fatores. Dependendo da situação é possível ter mais de uma resposta de interesse, e que talvez precisem ser consideradas simultaneamente^[87].

Para executar um planejamento fatorial, é preciso especificar os níveis em que cada fator deverá ser estudado, isto é, os valores dos fatores que serão usados para fazer os experimentos. Em um planejamento fatorial completo, deve-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Os planejamentos mais simples são aqueles em que todos os fatores são estudados em dois níveis, logo, para k fatores, um planejamento completo de dois níveis exige, no mínimo, a realização de $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, sendo chamados de planejamento fatorial 2^k ^[87].

As interações entre os fatores estudados somente podem ser identificadas empregando os métodos multivariados, pois no método univariado cada fator é otimizado de forma independente, ou seja, os experimentos são realizados variando-se o nível de apenas um determinado fator, enquanto os demais fatores do sistema são mantidos constantes. O inconveniente deste procedimento é que o valor ótimo de um fator pode depender dos níveis dos demais, ou seja, podem existir interações entre eles e a ordem dos fatores pode alterar o resultado final. Somente em métodos multivariados as interações podem ser visualizadas, pois a ordem dos experimentos não afeta a resposta, uma vez que todas as variáveis são estudadas simultaneamente. Além disso, as otimizações multivariadas permitem ao pesquisador sistematizar seu trabalho de forma mais objetiva e tratar todas as variáveis com igual importância, eliminando possíveis pré-julgamentos, os quais podem levar a interpretações equivocadas^[86].

Em função de características vantajosas, tais como, requerer um pequeno número de ensaios, funcionar bem na presença de erros aleatórios e principalmente, avaliar as interações entre as variáveis, permitindo verificar os efeitos sinérgicos ou antagônicos relacionados às respostas obtidas, os planejamentos experimentais são frequentemente aplicados a etapas de otimização de métodos analíticos^[88]. Semelhantemente, as ferramentas quimiométricas têm sido úteis para a otimização dos parâmetros em métodos voltamétricos, tais como, voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, onde é possível encontrar na literatura o emprego de planejamentos experimentais para obtenção das condições ótimas para detecção

eletroquímica^[89].

Bia e colaboradores^[90], por exemplo, empregaram a voltametria de onda quadrada associada a métodos quimiométricos para desenvolver um método simples e rápido para determinar o herbicida atrazina utilizando um eletrodo de filme de bismuto. Diferentes variáveis, tais como, pH, frequência, amplitude e incremento foram selecionadas através de um planejamento fatorial completo 2⁴. Posteriormente as, variáveis significativas foram otimizadas através de planejamento composto central combinado com a função desejabilidade. Desta forma, as condições otimizadas foram: pH 2,3, $f = 300 \text{ s}^{-1}$, $a = 0,09 \text{ V}$ e $\Delta E_s = 0,0024 \text{ V}$. Nas condições otimizadas o método tem uma resposta linear na faixa de $1,8$ a $7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com limites de detecção e quantificação de $5,9 \times 10^{-7}$ e $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Já Teófilo e colaboradores^[91] empregaram um planejamento experimental para otimizar a resposta da voltametria de onda quadrada na determinação do herbicida glifosato. As variáveis incremento, amplitude, frequência, concentração do eletrólito de suporte e a área da gota de mercúrio foram otimizadas através de um planejamento fatorial completo 2⁵. A partir destes resultados, três dos fatores foram escolhidos como os mais importantes para serem estudados através de um planejamento composto central. A melhor corrente de pico de redução do derivativo N-nitroso do glifosato foram: $0,025 \text{ V}$, $0,125 \text{ V}$, 70 s^{-1} , $1,25 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,60 \text{ mm}^2$ para o incremento, amplitude, frequência, concentração do eletrólito e área da gota de mercúrio, respectivamente. Nestas condições a faixa linear foi de $0,050$ a $100,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, com limites de detecção e quantificação de $0,025$ e $0,080 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

1.5 Validação de Método Analítico

Nos últimos anos, qualidade e confiabilidade em análises químicas são cada vez mais exigidas, visto que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação^[92]. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida e deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados^[93]. Os resultados, por sua vez, podem ser usados para avaliar a qualidade, aplicabilidade, precisão, confiabilidade e consistência; parte integrante necessária, em qualquer procedimento analítico^[94].

No termo validação de métodos é possível distinguir dois tipos: a validação no laboratório (“*in house validation*”), que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se um método adotado de outras fontes está bem aplicado. E a validação completa (“*full validation*”) que envolve todas as características de desempenho em um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como o método se comporta com uma determinada matriz analisada em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade do método e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo^[92].

De modo geral, os parâmetros analíticos típicos avaliados na etapa de validação de um novo método são: seletividade (especificidade), linearidade, intervalo, exatidão, precisão, (repetibilidade e precisão intermediária), robustez, limite de detecção e limite de quantificação (dependendo da finalidade do teste)^[93, 94, 95].

1.5.1 Especificidade e Seletividade

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da análise, estes interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração^[96]. Um método é tido como seletivo quando sofre pouco ou nenhuma influência de interferentes potenciais. Geralmente, a especificidade é atribuída a métodos analíticos capazes de quantificar analitos, na presença de outros componentes estruturalmente semelhantes que possam interferir na sua determinação, tais como, outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e/ou produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes^[92, 94].

1.5.2 Linearidade e Intervalo

A linearidade corresponde à capacidade do método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um intervalo especificado^[92]. Em um método voltamétrico a curva de calibração é construída em função da relação entre a corrente de pico e a concentração do analito. Recomenda-se que seja determinada pela análise de, no mínimo, seis concentrações diferentes, com triplicata para cada nível de concentração. Geralmente, os dados são processados utilizando o método de regressão linear, e os resultados podem ser úteis para fornecer estimativas matemáticas do grau de linearidade^[94]. O critério mínimo aceitável do

coeficiente de correlação (R) é de 0,99^[93].

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa usual de concentrações do analito, no qual o método é aplicado, e o intervalo de aplicação deve idealmente se situar no centro da faixa de trabalho^[96]. Em síntese, o intervalo é a faixa linear entre os valores de concentração superior e inferior do composto, o qual demonstre que o procedimento desenvolvido apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método^[93, 94].

1.5.3 Exatidão

A exatidão é um dos principais requisitos para a validação de métodos analíticos. Pode ser descrita como o grau de concordância entre o valor que é adotado como valor de referência (verdadeiro ou aceito) e o valor encontrado^[94]. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão^[92]. Em ensaios de recuperação, a exatidão é calculada como porcentagem de concordância da quantidade conhecida (verdadeira) do analito adicionado à amostra e a concentração obtida experimentalmente, deve ser obtido após ensaios de seletividade e linearidade^[93].

1.5.4 Precisão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea em condições determinadas, deve ser investigada com amostras homogêneas autênticas, ou amostras preparadas artificialmente, ou ainda uma solução da amostra^[95]. A precisão pode ser avaliada em três níveis, repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Repetibilidade (ou precisão intra-corrida): é a concordância entre os resultados dentro de um curto intervalo de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação, é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste^[93].

Precisão intermediária (ou precisão inter-corridas): é a concordância entre os resultados obtidos dentro do mesmo laboratório com algumas variações, tais como, diferentes

soluções estoque, dias diferentes, diferentes analistas, diferentes equipamentos, etc^[94].

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicado a padronização de método^[95].

A precisão é comumente expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%^[93].

1.5.1 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações, ou seja, a sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas mudanças dos parâmetros analíticos. Deste modo, indica sua confiança durante o uso normal. A avaliação da robustez é considerada durante o desenvolvimento do método e depende do tipo em estudo, constatando-se a susceptibilidade às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento^[92, 93, 94, 95].

1.5.2 Limite de detecção

Para determinações quantitativas em amostras com baixos níveis do analito ou análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito pode ser detectado pelo método^[96]. O Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas^[93]. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica^[92].

Método visual: pode ser usado para os métodos instrumentais e não-instrumentais, é determinado pela análise de amostras com concentrações conhecidas de analito e por determinação do nível mínimo ao qual a substância em análise pode ser detectado de forma segura.

Método da relação sinal-ruído: pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que exibem ruído da linha de base. A determinação da relação sinal-ruído é feita pela comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas

do analito de interesse e um branco. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser seguramente detectada. A relação sinal-ruído entre 3 ou 2:1 são geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção^[95].

Método baseado em parâmetros da curva analítica: O limite de detecção (LD) pode ser expresso pela equação (4):

$$LD = \frac{3s}{S} \quad (4)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica^[94, 93, 97].

1.5.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas^[95]. Para muitas aplicações farmacêuticas e biológicas, o LQ é geralmente parâmetro mais útil que o LD, uma vez que o LD é relevante apenas em métodos de análise de traços, quando as medições estão sendo feitas em concentrações próximas a esse limite. O valor de LQ sempre mais alto do que o valor do limite de detecção e é muitas vezes obtido como múltiplo do s do LD. Vários métodos são empregados para determinar o limite de quantificação, dependendo se o processo é ou não instrumental, analogamente aos do LD do item anterior^[94]. Assim, os mesmos critérios do LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta, a partir da equação (5):

$$LD = \frac{10s}{S} \quad (5)$$

Onde s pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação da curva analítica^[92].

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico simples, econômico e eficiente, orientado à determinação simultânea de espécies químicas de reconhecida importância farmacológica e cosmeceutica, empregando-se técnicas voltamétricas, associadas a ferramentas quimiométricas.

2.1 Objetivos Específicos

- 2.1.1 Empregar um eletrodo de carbono vítreo não modificado na determinação simultânea das associações: sulfametoxazol e trimetoprima (antibióticos) e ácido kójico e hidroquinona (agentes despigmentantes).
- 2.1.2 Estudar o comportamento voltamétrico dos fármacos frente ao eletrodo de carbono vítreo sob diferentes condições (pH da solução, eletrólito e concentração do analito);
- 2.1.3 Caracterizar o transporte de massa, através de estudos em diferentes velocidades de varredura de potencial;
- 2.1.4 Estudar a influência da variação da concentração hidrogeniônica do meio, na resposta voltamétrica dos fármacos;
- 2.1.5 Otimizar os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada, para a determinação voltamétrica dos fármacos de interesse;
- 2.1.6 Construir as curvas analíticas individuais e simultâneas referentes às espécies de interesse e obter os limites de detecção e quantificação;
- 2.1.7 Avaliar a viabilidade da aplicação da metodologia na quantificação simultânea dos fármacos, através de ensaios de recuperação.
- 2.1.8 Comparar os resultados obtidos pela metodologia voltamétrica desenvolvida para a determinação simultânea de trimetoprima e sulfametoxazol com os resultados obtidos pelo método farmacopeico oficial (HPLC);
- 2.1.9 Validar o método voltamétrico desenvolvido para determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona sob parâmetros de especificidade e seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limites de detecção e quantificação;
- 2.1.10 Aplicar o método voltamétrico desenvolvido na determinação das espécies de interesse em amostras reais (formulações farmacêuticas).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo de soluções foram de grau analítico PA ou superior.

Acetonitrila e trietilamina (ambos grau HPLC) foram utilizados como recebidos.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica e água destilada.

3.1.1 Fármacos e ativos

Sulfametoxazol e trimetoprima ambos do laboratório farmacêutico Far-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, com grau de pureza de 99%.

Ácido kójico da All Chemistry, com 99,5% de pureza e hidroquinona da LabSynth, com 99,4 % de pureza.

Ácido Ascórbico Sigma-Aldrich com 99% de pureza.

Metbissulfito de sódio da Biotec com 97% de pureza.

3.2 Preparo de Soluções

As soluções estoque dos padrões farmacêuticos de trimetoprima ($1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), ácido kójico ($2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e hidroquinona ($2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foram preparadas diariamente em água destilada, a de sulfametoxazol ($2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) por sua vez, foi preparada em solução 30% etanólica.

As soluções estoque dos padrões de interferentes: ácido ascórbico ($2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) e metabissulfito de sódio ($2,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) foram preparadas diariamente em água destilada.

As soluções trabalho foram preparadas pela diluição em soluções tampão.

A solução tampão Britton-Robinson (BR)^[98] foi preparada pela adição das seguintes soluções: 0,04 mol L⁻¹ de ácido ortofosfórico, 0,04 mol L⁻¹ de ácido bórico, 0,04 mol L⁻¹ de ácido acético e o pH requerido foi ajustado com hidróxido de sódio (2,0 mol L⁻¹).

A solução tampão McIlvaine^[99] foi preparada pela mistura de quantidades apropriadas das soluções: ácido cítrico 0,1 mol L⁻¹ e fosfato dissódico 0,2 mol L⁻¹.

3.3 Eletrodo de Carbono Vítreo

A limpeza do eletrodo de carbono vítreo comercial foi realizada por polimento (1 minuto) em suspensão aquosa de alumina de granulometria 0,3 μm impregnada sobre pano de polimento apropriado e umedecido com água destilada. Posteriormente, o eletrodo foi imerso em álcool isopropílico e colocado em banho de ultrassom durante 5 minutos para remover possíveis partículas incrustadas na superfície.

Depois do procedimento mecânico, foi realizada o pré-tratamento eletroquímico da superfície pela técnica da voltametria cíclica^[8]. Para isto, fez-se 30 ciclos em eletrólito suporte, na faixa de -0,2V a +1,0V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

3.4 Planejamento Fatorial

Os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada: frequência (f), amplitude de pulso (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) foram otimizados através de um planejamento fatorial completo 2^3 com quintuplicata do ponto central, sendo que a replicata realizada foi utilizada para o cálculo da estimativa do desvio padrão.

Para execução dos planejamentos, adicionou-se alíquotas da solução trabalho do fármaco em estudo em eletrólito suporte (tampão BR, pH=6 para SMX/TMP ou tampão McIlvaine pH=8 para AK/HQ), para obtenção de $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de trimetoprima, $5,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de sulfametoxazol, $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido kójico ou $4,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona na célula eletroquímica para análise voltamétrica.

A escolha dos valores dos níveis e do ponto central a serem investigados para cada parâmetro deu-se através de um estudo preliminar univariado, onde fixou-se dois parâmetros nos valores estabelecidos como padrões e variou-se o terceiro em uma faixa pré-determinada, de acordo com a tabela 04.

Tabela 04: Faixas de variação e valores estabelecidos como padrões para estudo preliminar univariado dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.

Parâmetro	Valor padrão estabelecido	Faixa de variação
Amplitude (a)	50 mV	05 - 80 mV
Frequência (f)	100 s^{-1}	10 - 200 s^{-1}
Incremento (ΔE_s)	2 mV	1 - 8 mV

Fonte: A autora.

Os melhores valores para os parâmetros encontrados no estudo univariado foram então selecionados e estabelecidos como níveis para o estudo multivariado através de planejamentos fatoriais.

As variáveis e os níveis utilizados no estudo multivariado são mostrados na Tabela 05

Tabela 05: Variáveis e níveis estudados nas otimizações dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.

SULFAMETOXAZOL			
Variáveis\Níveis	-1	0	+1
<i>Amplitude (mV)</i>	20	30	40
<i>Frequência (s⁻¹)</i>	80	90	100
<i>Incremento (mV)</i>	2	3	4
TRIMETOPRIMA			
Variáveis\Níveis	-1	0	+1
<i>Amplitude (mV)</i>	10	20	30
<i>Frequência (s⁻¹)</i>	80	90	100
<i>Incremento (mV)</i>	3	4	5
ÁCIDO KÓJICO			
Variáveis\Níveis	-1	0	+1
<i>Amplitude (mV)</i>	20	30	40
<i>Frequência (s⁻¹)</i>	60	70	80
<i>Incremento (mV)</i>	1	2	3
HIDROQUINONA			
Variáveis\Níveis	-1	0	+1
<i>Amplitude (mV)</i>	20	30	40
<i>Frequência (s⁻¹)</i>	20	30	40
<i>Incremento (mV)</i>	1	2	3

Fonte: A autora.

Foram realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados (Tabela 05), totalizando treze ensaios para cada planejamento fatorial, de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 06.

Tabela 06: Matriz do planejamento fatorial 2^3 para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada.

Ensaio	Variáveis		
	a	f	ΔE_s
01	-	-	-
02	+	-	-
03	-	+	-
04	+	+	-
05	-	-	+
06	+	-	+
07	-	+	+
08	+	+	+
09	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0

Fonte: A autora.

A resposta avaliada foi a corrente de pico anódica (I_{pa}) no caso do SMX ou a razão entre a corrente de pico (I_p) e a largura de meia altura do pico de potencial ($\Delta E_{p/2}$) para os demais analitos, com intuito de obter o sinal analítico em termos de sensibilidade e seletividade. Em seguida, foram calculados os efeitos principais e de interação, observando-se a presença ou não de efeitos significativos.

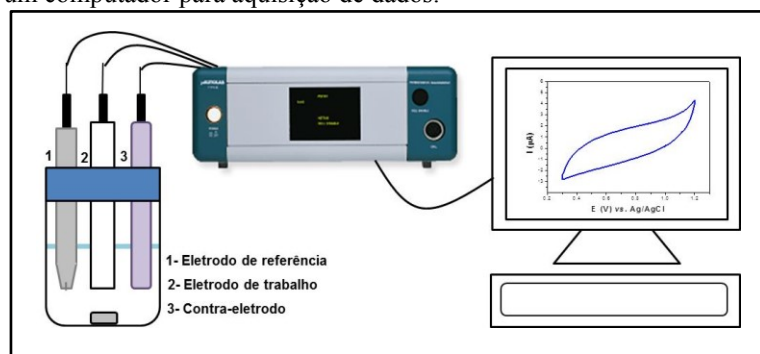
3.5 Medidas Voltamétricas

As medidas voltamétricas (cíclica e onda quadrada) foram realizadas em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$), utilizando-se uma cela eletroquímica (capacidade de 10 mL) com um sistema convencional de três eletrodos (comerciais): eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl saturado), contra-eletrodo de disco de platina (área = $12,57\text{mm}^2$) e eletrodo de carbono vítreo (área = $7,07\text{mm}^2$) como eletrodo de trabalho. Tais medidas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato $\mu\text{Autolab}$ (Tipo III) conectado a um microcomputador para aquisição de dados (software GPES versão 4.9), conforme esquema ilustrado na Figura 10.

Para construção das curvas analíticas dos fármacos, foram realizadas diluições a partir da solução estoque de cada analito, em eletrólito suporte (tampão BR, pH=6 ou tampão McIlvaine, pH=8). Os gráficos das curvas de calibração foram obtidos representando a

corrente *versus* concentração do analito. Todos os gráficos apresentados foram obtidos utilizando-se o software Origin Pro[®] 6.1 ou 8.0 após subtração de linha de base.

Figura 10: Célula eletroquímica contendo três eletrodos conectados ao potenciostato/galvanostato μ -Autolab, ambos conectados a um computador para aquisição de dados.



Fonte: A autora.

3.6 Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As medidas cromatográficas, adaptadas do método descrito na farmacopeia americana (USP)^[42], foram realizadas por meio de um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Varian 920-LC (Agilent Technologies), com detector de arranjo de diodos (DAD) ajustado em 216 nm (TMP) e 268 nm (SMX). O equipamento estava conectado a um computador controlado pelo software Varian Galaxie[™] Chromatography (versão 1.9).

Uma coluna C18 Microsorb 100-5 (250 x 4,6mm x 1/4") foi empregada. Durante as medidas a temperatura foi mantida em 25°C, com vazão de 1mL por minuto. A fase móvel consistiu de uma mistura de água deionizada, acetonitrila e trietilamina (modo isocrático), com pH em $5,9 \pm 0,1$ ajustado com $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio ou 1% v/v de ácido acético, sendo filtrada em membrana de acetato de celulose de 0,45 μm .

As soluções padrão foram preparadas com padrões de alto grau de pureza, em concentrações de $1,60 \text{ mg mL}^{-1}$ (SMX) e $0,32 \text{ mg mL}^{-1}$ (TMP) dissolvidos em metanol. A curva analítica foi elaborada a partir da diluição em fase móvel destas soluções, nas concentrações entre 32,0 e 224,0 mg mL^{-1} para SMX e entre 6,4 e 44,8 mg mL^{-1} para TMP, em um total de 7 amostras. As amostras foram injetadas automaticamente, sendo o volume de injeção de 20 μL .

3.7 Análise de Amostras Reais contendo SMX e TMP

As amostras de medicamentos contendo sulfametoxazol e trimetoprima de diferentes

marcas, dosagens e apresentação foram adquiridas em farmácias e hospitais locais. As especialidades e concentrações estudadas são apresentadas na Tabela 07.

Tabela 07: Amostras reais analisadas contendo sulfametoxazol e trimetoprima.

<i>Amostra</i>	<i>Forma de apresentação</i>	<i>Laboratório</i>	<i>Valor rotulado</i>	
			SMX	TMP
01*	Solução injetável	A	400 mg	80 mg
02	Solução injetável	B	400 mg	80 mg
03*	Comprimidos	A	400 mg	80 mg
04	Comprimidos	C	400 mg	80 mg
05*	Suspensão oral	A	200 mg	40 mg
06	Suspensão oral	D	200 mg	40 mg

*Medicamento de referência

Fonte: A autora.

3.7.1 Preparo das Amostras para Análise por Cromatografia

Nas análises cromatográficas, as amostras reais foram pré-tratadas seguindo o procedimento descrito na farmacopeia americana (USP)^[42].

Suspensão Oral: Uma alíquota (2 mL) do medicamento foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL com 30 mL de metanol, posteriormente, a solução foi sonicada e ocasionalmente agitada, durante 10 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, o menisco foi aferido com metanol, a amostra foi agitada e centrifugada. Então, 5 mL do sobrenadante foram transferidos a um segundo balão volumétrico de 50 mL e diluído com a fase móvel (água deionizada/acetonitrila/trietilamina). Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm e condicionada em frasco *vial* para ser analisada.

Comprimidos: Foram pesados 20 comprimidos comerciais inteiros e calculado a massa média de um comprimido, para os dois diferentes laboratórios (Bactrim: 0,5066g e Diazol: 1,1232g). Em seguida, estes comprimidos foram triturados em almofariz e uma quantidade apropriada de cada fabricante, contendo cerca 160 mg de sulfametoxazol, foi pesada e dissolvida em metanol. A solução foi sonicada por 5 minutos e filtrada em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm. Após a diluição com a fase móvel, a solução foi condicionada em frasco *vial* para ser analisada.

Injetável: 1mL da solução injetável do medicamento foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e diluída com metanol, posteriormente, uma alíquota desta solução foi transferida a um segundo balão e diluída com a fase móvel. Em seguida, a solução foi filtrada

em membrana de acetato de celulose de 0,45 μm e condicionada em frasco *vial* para ser analisada.

Todos os medicamentos foram analisados em triplicata, sendo que a determinação quantitativa dos fármacos foram realizadas pelas áreas dos picos aplicadas nas equações das retas obtidas pelas curvas analíticas.

3.7.2 Preparo das Amostras para Análise por Voltametria

Para obtenção das soluções estoque dos medicamentos, 20 comprimidos comerciais inteiros foram pesados para cálculo da massa média de um comprimido, dos dois diferentes laboratórios (Bactrim: 0,5066 g e Diazol: 1,1232 g). Em seguida, estes comprimidos foram triturados em almofariz e uma quantidade apropriada de cada fabricante foi pesada, dissolvida em solução 30% etanólica e sonicada por 10 minutos. Volumes apropriados da solução oral e da solução injetável foram devidamente diluídos em solução 30% etanólica. Alíquotas das soluções estoque das amostras reais foram diluídas com tampão BR, pH=6, a fim de obter concentrações finais dentro da faixa da curva analítica. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise voltamétrica.

Nenhum tratamento adicional nas amostras reais foi necessário. Todos os medicamentos foram analisados em triplicata e as quantidades de sulfametoxazol e trimetoprima foram determinadas através da intensidade do pico voltamétrico aplicado as equações das retas obtidas pelas curvas analíticas.

3.8 Parâmetros de Validação do Método Voltamétrico para Determinação de Ácido Kójico e Hidroquinona

O método voltamétrico desenvolvido para determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona foi validado sob os parâmetros analíticos: especificidade, linearidade, intervalo, exatidão, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção e de quantificação.

3.8.1 Exatidão e Especificidade

A exatidão e a especificidade do método proposto foram avaliadas através dos ensaios de recuperação em base gel (Natrosol®) e creme (Lanette®), onde quantidades conhecidas de ácido kójico e hidroquinona padrão foram adicionadas ao veículo (sem adição

de conservantes) e posteriormente determinadas. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida dos fármacos adicionados ao veículo, segundo a fórmula (4):

$$\text{exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

Para o preparo das seis amostras (Tabela 08), um saco plástico transparente foi acondicionado em um béquer de forma que possibilitasse a pesagem dos materiais, inicialmente pesou-se o ácido kójico, em seguida a hidroquinona, e por fim o veículo, de modo a totalizar cerca de 5,0 g de clareador, misturou-se bem.

Tabela 08: Ensaios de recuperação de ácido kójico e hidroquinona para determinação da exatidão e especificidade.

<i>Amostra</i>	<i>Veículo</i>	<i>Concentração</i>	
		AK	HQ
01	Gel	1,02 %	2,00 %
03	Gel	2,03 %	2,00 %
05	Gel	3,99 %	3,01 %
02	Crema	0,99%	2,01 %
04	Crema	2,00 %	1,98 %
06	Crema	4,08 %	3,06 %

Fonte: A autora.

Cada amostra foi analisada em triplicata, para isto, uma quantidade do clareador foi pesada (cerca de 1,0000 grama), diluída com água destilada em balão volumétrico de 100 ml e agitada vigorosamente. Posteriormente, uma alíquota apropriada desta solução foi diluída com solução tampão McIlvaine (pH=8,0) em balão volumétrico de 10 mL, a fim de obter concentrações finais dentro da faixa da curva analítica e em seguida foi submetida à análise voltamétrica. As quantidades de AK e HQ foram determinadas através da intensidade dos picos voltamétricos aplicados as equações das retas obtidas pelas curvas analíticas.

3.8.2 *Linearidade e Intervalo*

A linearidade do método voltamétrico desenvolvido foi avaliada por meio dos coeficientes de correlação linear obtidos através das curvas analíticas construídas a partir de

alíquotas das soluções estoque dos agentes despigmentantes. Também foi possível verificar a faixa de trabalho, ou seja, o intervalo linear que compreende desde a menor concentração, onde é possível realizar uma medida quantitativa, até a concentração onde a curva desvia da linearidade.

3.8.3 Precisão

A precisão foi aferida em termos de repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corrida). A repetibilidade foi verificada por 3 determinações voltamétricas simultâneas de ácido kójico e hidroquinona, realizadas em triplicatas, contemplando o intervalo linear do método. Para o ensaio de precisão intermediária, foram refeitos os procedimentos do ensaio de repetibilidade em dias diferentes, por analistas diferentes, no mesmo laboratório e equipamentos.

A precisão foi expressa na forma de coeficiente de variação (CV%), segundo a equação (6):

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (6)$$

Onde DP = estimativa do desvio padrão e CMD = concentração média determinada. Considerou-se satisfatórios valores de CV inferiores a 5%^[93].

3.8.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica, ou seja, pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas de calibração pela média dos coeficientes angulares destas respectivas curvas, multiplicados por 3 e 10, respectivamente.

3.9 Análise de Amostras Reais contendo AK e HQ

Amostras de dermocosméticos em base gel (Natrosol®) e em creme (Lanette®), contendo a associação em estudo foram analisadas.

As formulações comerciais (Tabela 09), contendo diferentes concentrações de ácido

kójico e hidroquinona (e agentes antioxidantes) foram obtidas em duas farmácias de manipulação na região de Ponta Grossa/PR. Ambas as farmácias de manipulação utilizam apenas o metabissulfito de sódio (10% da concentração de HQ) como conservante.

Tabela 09: Amostras reais de clareadores (base gel e creme), contendo ácido kójico e hidroquinona obtidos em farmácias de manipulação da região de Ponta Grossa/PR..

<i>Amostra</i>	<i>Veículo</i>	<i>Origem</i>	<i>Concentração declarada</i>	
			AK	HQ
01	Gel	Manipulação A	2,0 %	2,0 %
02	Gel	Manipulação A	4,0 %	3,0 %
03	Creme	Manipulação A	2,0 %	2,0 %
04	Creme	Manipulação A	1,0 %	2,0 %
05	Gel	Manipulação A	2,0 %	1,0 %
06	Gel	Manipulação B	2,0 %	2,0 %
07	Gel	Manipulação B	1,0 %	2,0 %
08	Creme	Manipulação B	2,0 %	2,0 %

Fonte: A autora.

Para análise, uma quantidade do clareador foi pesada (cerca de 1,0000 grama), diluída com água destilada em balão volumétrico de 100 ml e agitada vigorosamente, posteriormente, uma alíquota apropriada desta solução foi diluída com solução tampão McIlvaine pH 8,0 em balão volumétrico de 10 mL, a fim de obter concentrações finais dentro da faixa da curva analítica e em seguida submetida à análise voltamétrica. Nenhum tratamento adicional nas amostras reais foi necessário. Todas as amostras reais foram analisadas em triplicata e as quantidades de hidroquinona e ácido kójico foram determinadas através da intensidade dos picos voltamétricos aplicados as equações das retas obtidas pelas curvas analíticas.

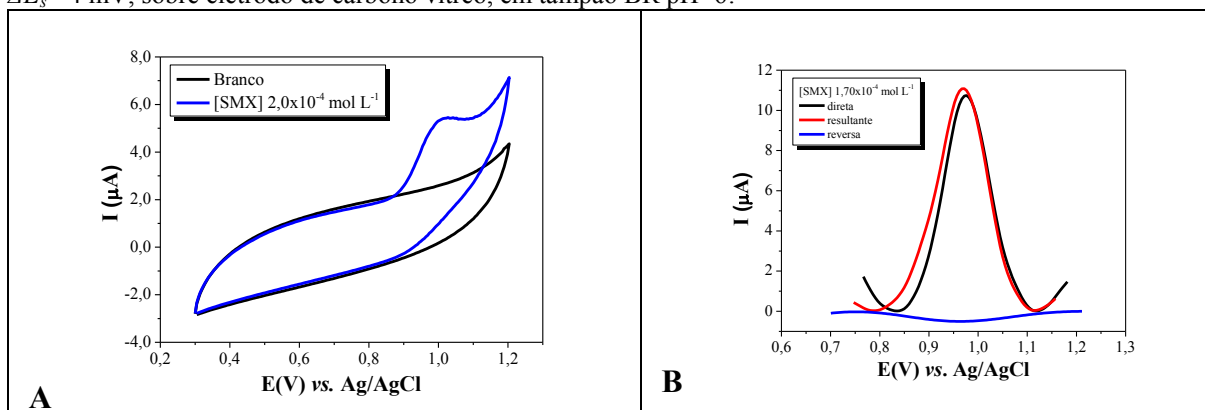
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Associação Sulfametoxazol e Trimetoprima

4.1.1 Comportamento voltamétrico do sulfametoxazol sobre ECV

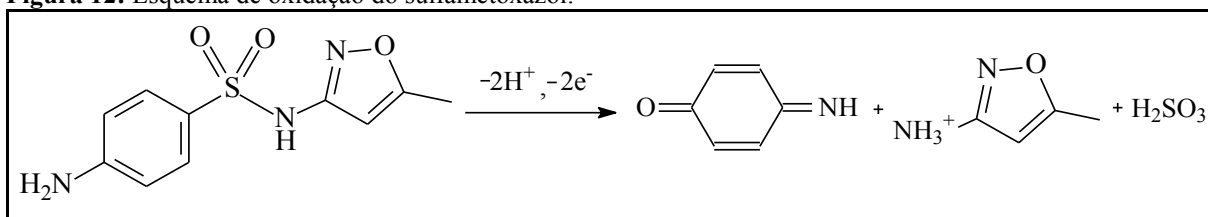
O comportamento voltamétrico do sulfametoxazol foi estudado no eletrodo de carbono vítreo em tampão BR, pH 6,0. O voltamograma cíclico obtido após uma variação de potencial positiva de 0,0 a +1,2 V seguida da variação de potencial negativa de +1,2 a 0,0 V, é apresentado na Figura 11A. Nesta figura foi possível observar que o sulfametoxazol apresenta somente um pico de oxidação em torno de +0,96 V vs. Ag/AgCl, com características de um processo irreversível, uma vez que o voltamograma não apresenta pico no sentido da varredura reversa. Na análise das componentes de corrente da voltametria de onda quadrada o mesmo foi observado (Figura 11B), o pulso no sentido direto produz uma corrente anódica, enquanto o pulso no sentido inverso produz corrente catódica, sendo a diferença dessas correntes obtida como um voltamograma resultante^[7].

Figura 11: (A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de sulfametoxazol a $v = 50$ mV s⁻¹ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $1,70 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de sulfametoxazol, com $f = 100$ s⁻¹, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR pH=6.



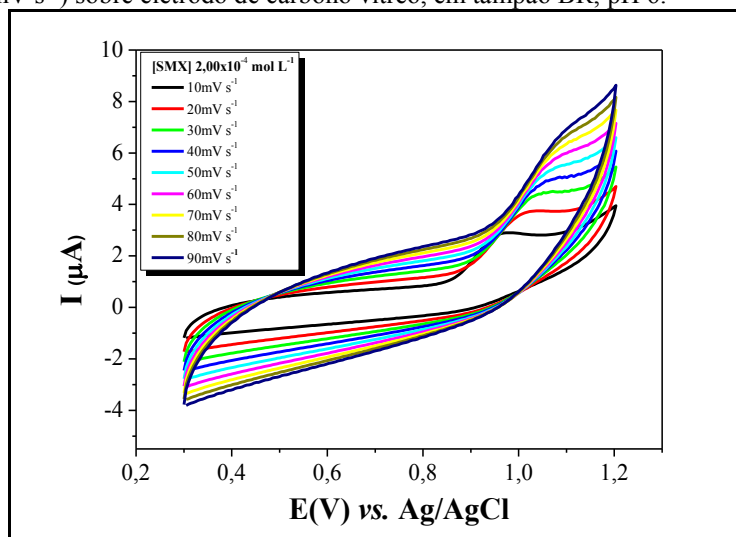
Fonte: A autora.

De acordo com estudos descritos na literatura, as sulfonamidas amino substituídas podem ser eletroquimicamente oxidadas no grupo amino primário (-NH₂), mas a redução no grupo sulfamil (-SO₂NHR) é difícil de ocorrer^[36, 100, 101]. Para o sulfametoxazol, o pico de oxidação obtido é atribuído a eletrooxidação do grupo amino para iminobenzoquinona, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12: Esquema de oxidação do sulfametoxazol.

Fonte: Adaptado de [100].

A influência da velocidade de varredura no pico de oxidação do SMX foi investigada pela voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10 a 90 mV) são apresentados na Figura 13. Observou-se que o aumento da velocidade de varredura desloca o pico de corrente para valores de potenciais mais positivos. Para processos eletródicos reversíveis, o potencial de pico independe da velocidade de varredura^[9, 11], logo pode-se confirmar que o processo associado à reação de oxidação do sulfametoxazol é mesmo irreversível.

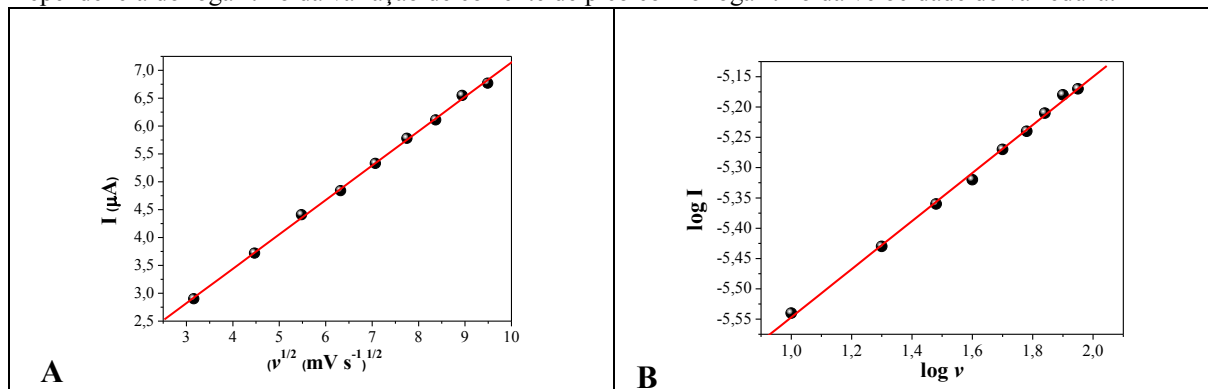
Figura 13: Voltamogramas cíclicos de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de sulfametoxazol em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s⁻¹) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR, pH 6.

Fonte: A autora

Além disso, a corrente de pico anódica varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($R=0,9995$) (Figura 14A), indicando que o processo de transferência de massa é controlado pela difusão das espécies à superfície do eletrodo^[9]. Na Figura 13B é apresentado o gráfico do logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura, onde se observou uma relação linear com inclinação de 0,40, este valor está próximo do previsto pela literatura (0,5) para sistemas controlados pela difusão das espécies^[102], corroborando ao observado na Figura 13B. Este

comportamento difusional também foi observado por Souza e colaboradores^[36] sobre eletrodo de diamante dopado com boro e por Joseph e Kumar^[101] sobre eletrodo de pasta de carbono modificado com [5,10,15,20- tetrakis (3-metoxi-4- hidroxi fenil) porfirinato] Cu(II).

Figura 14: (A) Dependência da variação de corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura (B) Dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.

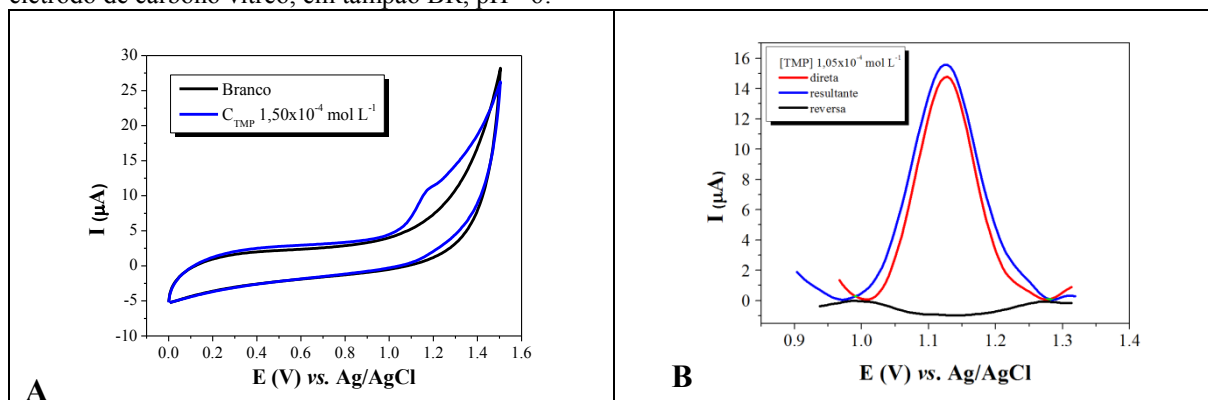


Fonte: A autora.

4.1.2 Comportamento voltamétrico da trimetoprima sobre ECV

O comportamento voltamétrico da trimetoprima foi estudado sobre eletrodo de carbono vítreo em eletrólito suporte (tampão BR pH=6,0). No voltamograma cíclico obtido na faixa de potencial de 0,0 a 1,5V foi possível observar um pico de oxidação irreversível em 1,12 V vs. Ag/AgCl (Figura 15A). Na análise das componentes de corrente da voltametria de onda quadrada (Figura 15B), o mesmo comportamento foi constatado, no qual a corrente resultante é bastante semelhante à direta e a corrente reversa não apresenta pico, comportamento característico de sistemas irreversíveis^[7].

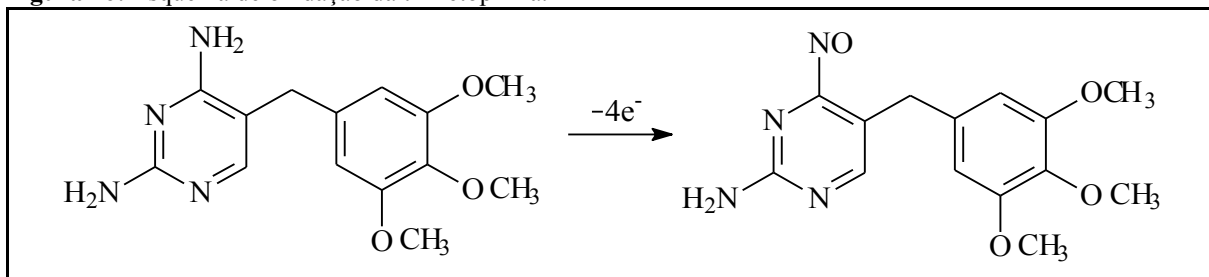
Figura 15: (A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $1,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de trimetoprima a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de trimetoprima, $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR, pH =6.



Fonte: A autora.

Segundo reportado na literatura, a trimetoprima é eletroquimicamente oxidada envolvendo a transferência de quatro elétrons ^[103, 104, 105]. O grupo amino (-NH₂) da posição 4, é oxidado a NO, de acordo com o esquema apresentado na Figura 16, nesta molécula existem dois grupos amino, um na posição 2 (mais estável em função dos dois N) e outro na posição 4 do anel pirimidina, este, segundo estudos computacionais reportado na literatura, está mais suscetível a oxidação ^[103].

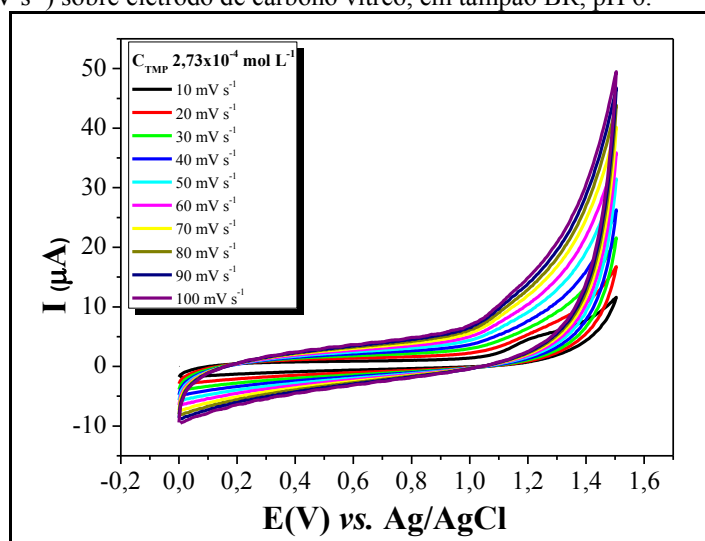
Figura 16: Esquema de oxidação da trimetoprima.



Fonte: [103].

Para caracterização do transporte de massa, voltamogramas em diferentes velocidades de varredura (de 10 a 100 mV) foram obtidos para uma concentração fixa de trimetoprima ($2,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), os quais são apresentados na Figura 17.

Figura 17: (A) Voltamogramas cíclicos de $2,73 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de trimetoprima em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR, pH 6.

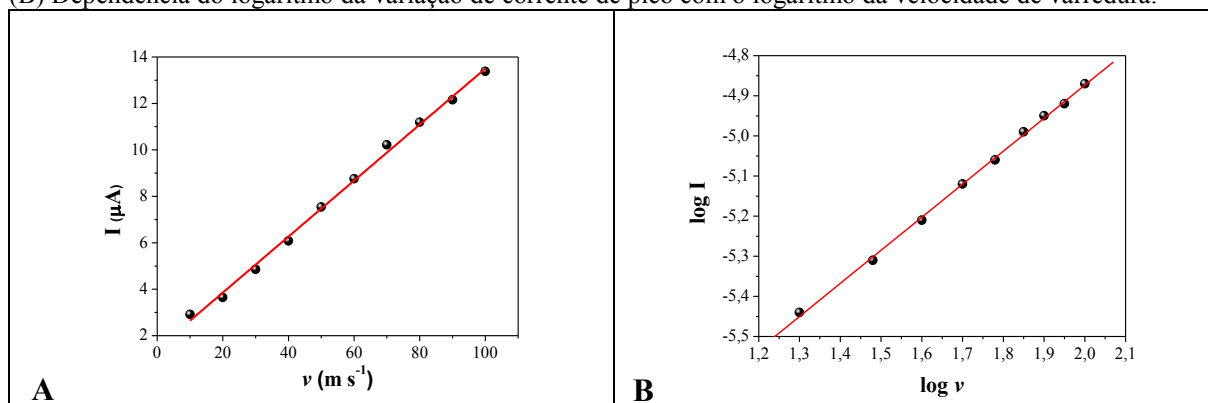


Fonte: A autora.

Observou-se que a corrente de pico anódica varia linearmente com a velocidade de varredura de potencial ($R = 0,9983$), caracterizando um processo adsorptivo na superfície eletródica ^[9] (Figura 18A), o mesmo foi observado na Figura 18B onde a relação linear do

logaritmo da intensidade de corrente de pico em função do logaritmo da velocidade de varredura (de 20 a 100 mV), tem inclinação de 0,82, este valor é próximo do previsto pela literatura (1,0) para sistemas adsorptivos^[102]. O comportamento adsorptivo também foi observado por Rajith e Kumar^[106] sobre o eletrodo de carbono vítreo modificado com metaloporfirina de Mn (III).

Figura 18: (A) Dependência da variação de corrente de pico com a velocidade de varredura (mV s^{-1}) (B) Dependência do logaritmo da variação de corrente de pico com o logaritmo da velocidade de varredura.



Fonte: A autora.

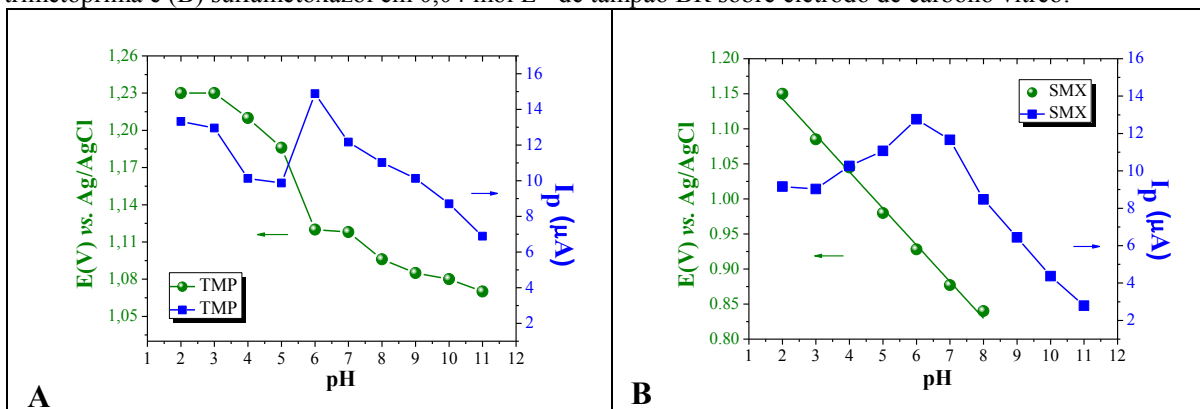
4.1.3 Influência do pH na resposta voltamétrica de SMX e TMP

A influência da variação da concentração hidrogeniônica do meio, na resposta voltamétrica de $1,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sulfametoxazol e $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de trimetoprima, foi avaliada em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR, variando o pH de 2 a 11. No estudo, observou-se que ambos os fármacos apresentaram resposta voltamétrica em toda faixa de pH estudada, sendo a maior intensidade de corrente obtida em pH 6 (Figura 19). No pH otimizado, outras soluções tampão, tais como, acetato, fosfato, mcllvaine foram testadas, no entanto a melhor resposta foi obtida em tampão BR, o qual foi escolhido para as demais análises. Adicionalmente, observou-se pequenos deslocamentos nos potenciais de pico anódico da trimetoprima com o aumento do pH da solução (Figura 19A). Os potenciais de pico anódico do sulfametoxazol deslocam-se para valores menos positivos à medida que o pH aumenta, comportamento típico de processos onde ocorre prévia protonação da espécie, indicando que a oxidação eletroquímica é dependente do pH, pois a desprotonação no processo de oxidação é facilitada em maiores valores de pH^[107]. Uma relação linear foi observada na faixa de pH de 2 a 8 (Figura 19B), com inclinação de -52 mV pH^{-1} , a equação (7) representa a correlação entre o potencial de pico anódico e o pH do SMX, onde os valores de potencial são dados em Volt.

$$E_p \text{ (vs. Ag/AgCl)} = 1,247 - 0,052 \text{ pH, } R=0,9978 \quad (7)$$

O valor encontrado está próximo da inclinação nernstiana teórica de -59 mV pH^{-1} , sugerindo que o número de elétrons e prótons envolvidos no processo são iguais, ou seja, dois prótons participam da oxidação^[108], em concordância com o mecanismo proposto por Momberg e colaboradores^[100].

Figura 19: Relação entre pH e potencial de pico (eixo y-esquerdo) e corrente de pico (eixo y-direito) para (A) trimetoprima e (B) sulfametoxazol em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR sobre eletrodo de carbono vítreo.



Fonte: A autora.

4.1.4 Análise individual de sulfametoxazol

4.1.4.1 Otimização dos parâmetros da VOQ para determinação de SMX

Para o desenvolvimento de um método eletroanalítico em que se emprega a voltametria de onda quadrada para quantificar as espécies, faz-se necessário otimizar os parâmetros instrumentais que possam influenciar a resposta voltamétrica, tais como, amplitude, incremento e frequência. Na voltametria de onda quadrada, a velocidade efetiva é o resultado do produto da frequência de aplicação dos pulsos de potencial pelo incremento de varredura de potencial^[7].

Com o intuito de obter maior sensibilidade de corrente, os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada, frequência (f), amplitude de pulso (a) e o incremento de varredura de potencial (ΔE_s) foram otimizados, através de um planejamento fatorial completo 2^3 com quintuplicata do ponto central, sendo que a replicata realizada foi utilizada para o cálculo da estimativa do desvio padrão. As variáveis e os níveis estudados (escolhidos através de um estudo preliminar univariado) foram: $f = 80 \text{ s}^{-1}$ (-1) e 100 s^{-1} (+1); $a = 20 \text{ mV}$ (-1) e 40 mV (+1) e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ (-1) e 4 mV (+1). Os resultados da otimização via planejamento

fatorial são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados da otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o sulfametoxazol, via planejamento fatorial 2^3 .

Corrida	Variáveis			Resposta
	a	f	ΔE_s	Corrente (μA)
01	-	-	-	2,77
02	+	-	-	4,30
03	-	+	-	3,42
04	+	+	-	4,40
05	-	-	+	3,50
06	+	-	+	4,82
07	-	+	+	3,67
08	+	+	+	5,23
09	0	0	0	3,34
10	0	0	0	3,44
11	0	0	0	3,43
12	0	0	0	3,38
13	0	0	0	3,37

Fonte: A autora.

O tratamento estatístico dos resultados evidenciou que os fatores que obtiveram efeito significativo com 95% de confiança ($0,0418 \times t_{95\%, v=4} = 0,1161$) para os valores de Ipa foram: frequência de aplicação de pulso de potencial, amplitude do pulso de potencial e incremento de potencial, assim como a interação entre os três fatores analisados (Tabela 11).

Tabela 11: Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o sulfametoxazol, via planejamento fatorial 2^3 .

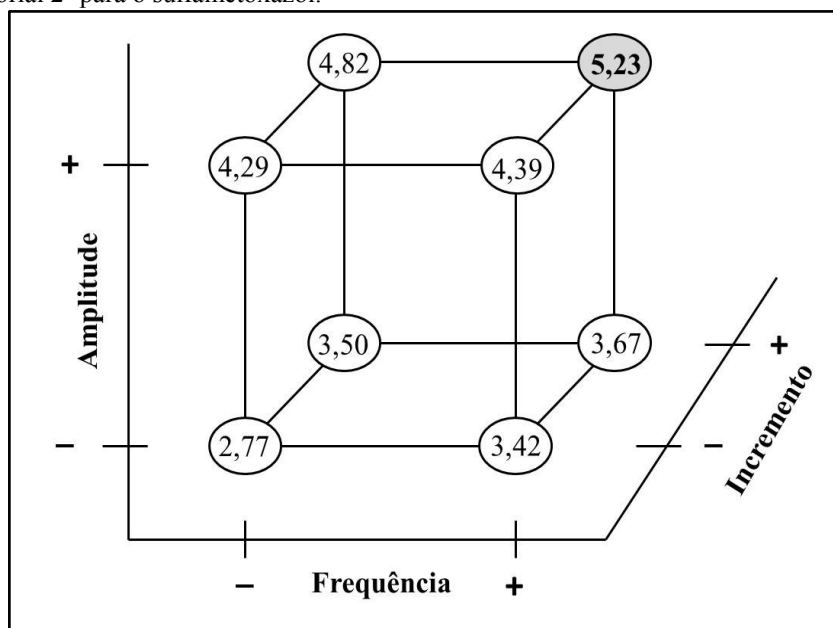
	Efeito Principal	Efeito de interação
Amplitude (a)	+1,3456	-
Incremento (ΔE_s)	+0,5839	-
Frequência (f)	+0,3318	-
$a \times \Delta E_s$	-	0,0968
$a \times f$	-	-0,0745
$f \times \Delta E_s$	-	-0,0412
$a \times \Delta E_s \times f$	-	0,1972

Fonte: A autora.

Uma vez que o efeito de interação de terceira ordem é significativo, os demais efeitos

não podem ser interpretados individualmente. Assim, o efeito de interação de terceira ordem pode ser melhor visualizado na interpretação geométrica mostrada na Figura 20.

Figura 20: Interpretação geométrica do efeito de interação *amplitude vs. incremento vs. frequência* do planejamento fatorial 2^3 para o sulfametoxazol.



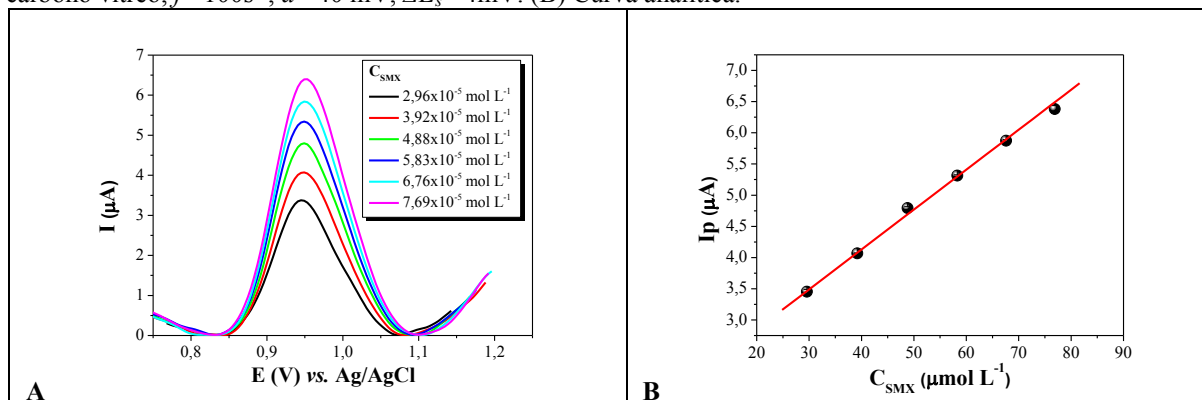
Fonte: A autora.

Nesta figura, é possível observar que para qualquer um dos fatores estudados, há um aumento de corrente para o SMX quando passamos do nível menor para o nível maior, sendo uma maior sensibilidade de corrente ($I_{pa} = 5,23 \mu A$) alcançada no vértice +++, ou seja, a $f = 100 s^{-1}$, $a = 40 mV$ e $\Delta E_s = 4 mV$, estes parâmetros otimizados foram utilizados para a construção da curva analítica para determinação individual de sulfametoxazol.

4.1.4.2 Curva analítica otimizada para determinação individual de SMX

Utilizando-se os parâmetros voltamétricos otimizados ($f = 100 s^{-1}$, $a = 40 mV$ e $\Delta E_s = 4 mV$), curvas analíticas ($n = 3$) foram construídas pela adição de pequenas alíquotas da solução estoque de SMX. A Figura 21A, mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de concentração de $2,96 \times 10^{-5}$ a $7,69 \times 10^{-5} mol L^{-1}$ de sulfametoxazol e a Figura 21B, a curva analítica construída. A equação da reta obtida foi: $I_{pa} = 1,57 \times 10^{-6} + 0,0640 C_{SMX}$ com coeficiente de correlação igual a 0,9990.

Figura 21: (A) Voltamogramas de onda quadrada de sulfametoxazol, em tampão BR (pH=6) sobre o eletrodo de carbono vítreo, $f=100\text{s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=4\text{mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

4.1.5 Obtenção das condições otimizadas para determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima

4.1.5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais da VOO

Uma vez que o objetivo do presente trabalho é desenvolver um método-analítico que permita quantificar simultaneamente trimetoprima e sulfametoxazol, optou-se por obter o melhor sinal analítico para determinação de TMP e posteriormente utilizá-lo para determinação simultânea dos fármacos, uma vez que é a trimetoprima está em menor quantidade nas formulações do medicamento (proporção molar 5,74 SMX: 1 TMP).

Assim, os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada (f , a e ΔE_s) foram simultaneamente avaliados através de um planejamento fatorial completo 2^3 com quintuplicata do ponto central, para o cálculo da estimativa do desvio padrão. Desta vez, a resposta avaliada foi a razão entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a largura de meia altura do pico de potencial ($\Delta E_{p/2}$) para obtenção do melhor sinal analítico em termos de sensibilidade e seletividade^[35], uma vez que a resposta analisada é a razão entre dois parâmetros, valores maiores desta relação indicam maiores valores de corrente (maior sensibilidade) com menores larguras de pico (maior seletividade). As variáveis e os níveis estudados (estabelecidos através de um estudo univariado prévio) foram: $f=80\text{ s}^{-1}$ (-1) e 100 s^{-1} (+1); $a=10\text{mV}$ (-1) e 30mV (+1) e $\Delta E_s=3\text{ mV}$ (-1) e 5 mV (+1). Os resultados da otimização via planejamento fatorial são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados da otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para a trimetoprima, via planejamento fatorial 2^3 .

Corrida	Variáveis			Resposta
	<i>a</i>	<i>f</i>	ΔE_s	Corrente (μA) / Potencial (V)
01	-	-	-	29,23
02	+	-	-	68,88
03	-	+	-	34,10
04	+	+	-	85,19
05	-	-	+	36,12
06	+	-	+	93,16
07	-	+	+	43,39
08	+	+	+	108,44
09	0	0	0	66,40
10	0	0	0	65,27
11	0	0	0	64,64
12	0	0	0	65,42
13	0	0	0	64,44

Fonte: A autora.

O tratamento estatístico dos resultados evidenciou que os fatores que obtiveram efeito significativo com 95% de confiança ($0,77 \times 2,78 \ t_{95\%, v=4} = 2,14$) para os valores de $I_{pa}/\Delta E_{p/2}$ foram: frequência de aplicação de pulso de potencial, amplitude do pulso de potencial e incremento de potencial, assim como a interação entre amplitude e frequência, e amplitude e incremento (Tabela 13).

Tabela 13: Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para a trimetoprima, via planejamento fatorial 2^3 .

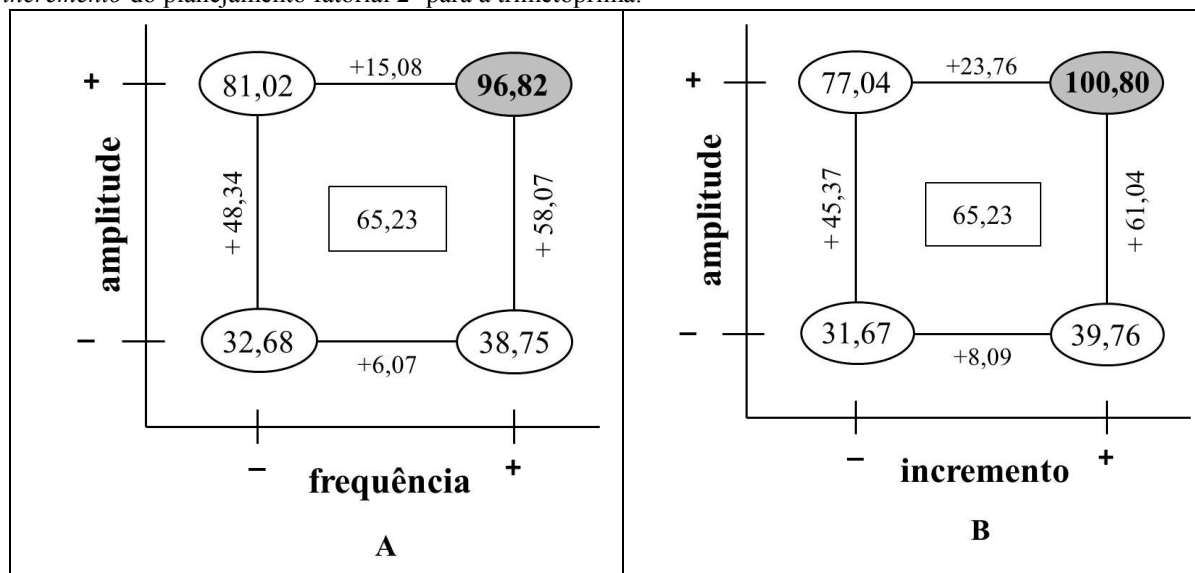
	Efeito Principal	Efeito de interação
Amplitude (<i>a</i>)	+53,21	-
Incremento (ΔE_s)	+15,93	-
Frequência (<i>f</i>)	+10,93	-
<i>a</i> x ΔE_s	-	7,84
<i>a</i> x <i>f</i>	-	4,86
<i>f</i> x ΔE_s	-	0,34
<i>a</i> x ΔE_s x <i>f</i>	-	0,86

Fonte: A autora.

Uma vez que há efeitos de interação de segunda ordem significativos, os efeitos principais não podem ser interpretados individualmente. Assim, o efeito de interação

amplitude vs. frequência e amplitude vs. incremento podem ser melhor visualizados nas interpretações geométricas mostradas na Figura 22, nos vértices das interpretações geométricas foram considerados as médias para as possíveis combinações entre os fatores.

Figura 22: Interpretação geométrica dos efeitos de interação (A) *amplitude vs. frequência* e (B) *amplitude vs. incremento* do planejamento fatorial 2^3 para a trimetoprima.



Fonte: A autora.

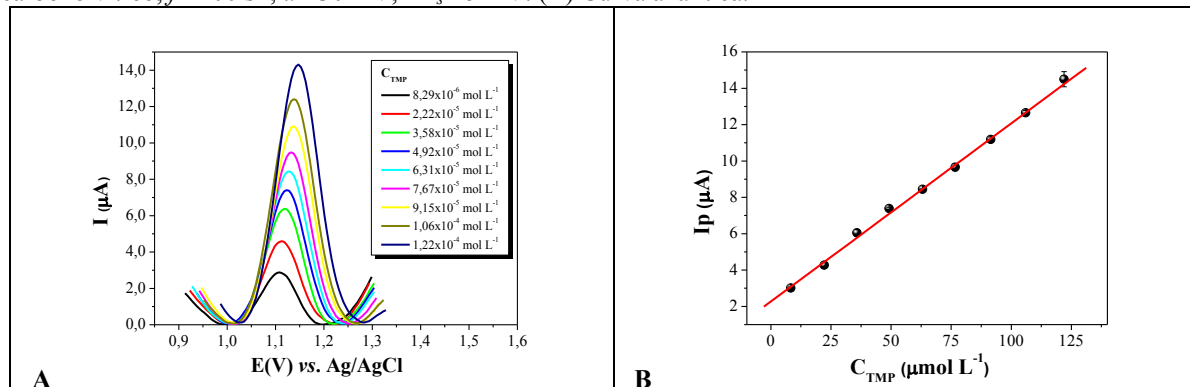
Nas figuras 22A e 22B, é possível observar que o melhor sinal analítico é obtido nos vértices (96,82 e 100,80 $\mu\text{A/V}$) para qualquer dos efeitos de interação, de acordo com os seguintes valores: frequência (f), 100 s^{-1} ; amplitude do pulso (a), 30 mV e incremento de varredura de potencial (ΔE_s), 5 mV, os quais foram utilizados para as análises seguintes. É pertinente salientar, que os parâmetros otimizados para análise simultânea dos fármacos, estão próximos aos obtidos para determinação individual de SMX, uma vez que a frequência a ser utilizada é a mesma, e os valores de amplitude e frequência diferem em apenas 10 e 1 mV, respectivamente, isso evidencia que não haverá severa perda de sensibilidade para a determinação de sulfametoxazol, mesmo nas condições otimizadas para trimetoprima.

4.1.5.2 Curva analítica para determinação individual de TMP

Empregando-se os parâmetros voltamétricos otimizados ($f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 30 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$), curvas analíticas ($n = 3$) foram construídas pela adição de pequenas alíquotas da solução estoque de trimetoprima. A Figura 23A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de concentração de $8,29 \times 10^{-6}$ a $1,22 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de TMP e a Figura 23B a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $I_{pa} = 2,28 \times 10^{-6} + 0,0979 C_{\text{TMP}}$ com coeficiente

de correlação igual a 0,9986.

Figura 23: (A) Voltamogramas de onda quadrada de trimetoprima, em tampão BR (pH=6) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

O aumento linear das correntes de pico anódica com o aumento da concentração do fármaco possibilitou o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), seguindo-se os critérios definidos pela IUPAC^[97], de acordo com as equações (8) e (9) abaixo:

$$LD = \frac{3S_b}{s} \quad (8)$$

$$LQ = \frac{10S_b}{s} \quad (9)$$

Onde, S_b é o desvio padrão da média de medidas dos brancos ($n=10$) e s é o coeficiente angular das curvas analíticas ($n=3$). Desta forma, em eletrólito suporte, ou seja, tampão BR (pH=6), os valores de LD e LQ calculados foram $1,39 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,40 \text{ mg L}^{-1}$) e $4,64 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,35 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. O valor de LD é muito próximo ao obtido por Yang e Jin^[104] também para eletrodo de carbono vítreo em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 ($4,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

4.1.5.3 Ensaios de recuperação individual de TMP

A fim de avaliar a viabilidade da utilização do método para quantificação de trimetoprima, realizou-se ensaios de recuperação em eletrólito suporte (tampão BR, pH= 6,0), pelo método de calibração externa, utilizando a equação da reta obtida na curva analítica para determinação de trimetoprima ($f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$ e $\Delta E_s=5\text{ mV}$). Os resultados obtidos para as determinações em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados dos ensaios de recuperação de trimetoprima, em tampão BR (pH=6), sobre eletrodo de carbono vítreo, com $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$.

	Concentração 01	Concentração 02	Concentração 03
Valor real (mol L⁻¹)	3,00x10 ⁻⁵	6,50x10 ⁻⁵	9,50x10 ⁻⁵
Valor experimental médio (mol L⁻¹)	3,04x10 ⁻⁵	6,75x10 ⁻⁵	9,25x10 ⁻⁵
Desvio padrão (n=3)	1,40x10 ⁻⁶	1,36x10 ⁻⁶	1,88x10 ⁻⁶
Recuperação média (n=3)	101,33%	103,85%	97,37%
DPR	4,62%	2,02%	2,03%

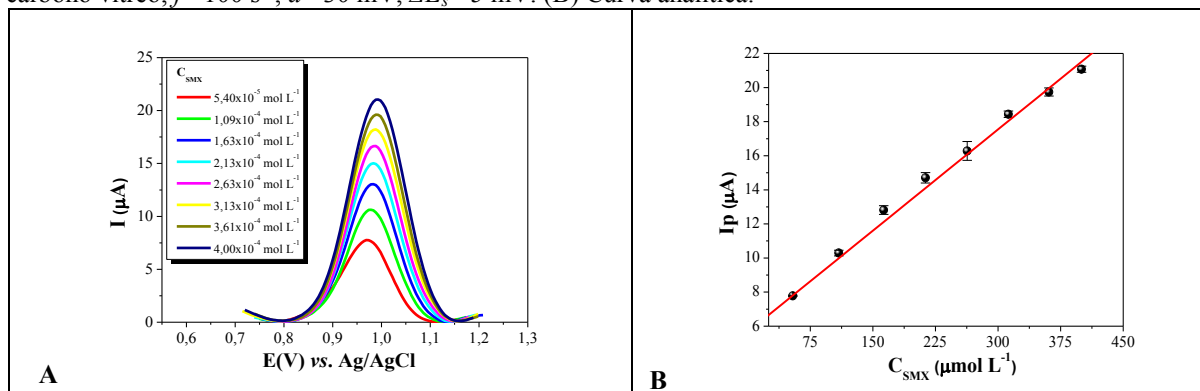
Fonte: A autora.

Os valores médios de recuperação (97,37% – 103,85%) estão próximos do valor teórico (100%), evidenciando a eficiência do método proposto para determinação de trimetoprima, sugerindo que este procedimento possa ser aplicado em amostras reais. Os valores de recuperação e desvio padrão relativo obtidos estão próximos aos obtidos por Yang e Jin^[104] nos ensaios de recuperação por adição de padrão de trimetoprima, onde as taxas de recuperação encontradas foram na faixa de 96,1% a 101,6% com DPR de 3,2%, para n= 5.

4.1.5.4 Curva analítica para SMX nas condições para análise simultânea

Utilizando-se os parâmetros voltamétricos otimizados ($f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$ e $\Delta E_s=5\text{ mV}$) para a determinação de trimetoprima e posterior determinação simultânea, curvas analíticas (n= 3) foram construídas, em faixas maiores de concentração em função da proporção molar dos fármacos, pela adição de pequenas alíquotas da solução estoque de SMX. A Figura 24A ilustra os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de concentração de $5,40 \times 10^{-5}$ a $4,00 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de sulfametoxazol e a Figura 24B a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $I_{pa}= 5,66 \times 10^{-6} + 0,0396\text{ C}_{\text{SMX}}$ com coeficiente de correlação igual a 0,9989.

Figura 24: (A) Voltamogramas de onda quadrada de sulfametoxazol, em tampão BR pH=6, sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

Observou-se um aumento linear das correntes de pico anódica com o aumento da concentração do fármaco, o que possibilitou o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)^[97]. Portanto, em eletrólito, os valores de LD e LQ calculados foram $7,92 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$ ($200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) e $2,64 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ ($668\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente.

Ao comparar os limites de detecção e quantificação obtidos para o SMX sobre ECV com os reportados na literatura para outros eletrodos, pode-se constatar que o eletrodo utilizado possui LDs menores que os obtidos pelos eletrodos de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono^[109] ($1,00 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$) e diamante dopado com boro^[36] ($1,15 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$).

4.1.5.5 Ensaios de recuperação individual de SMX

O estudo de recuperação, pelo método de calibração externa, em eletrólito suporte (tampão BR, pH= 6,0) contendo o sulfametoxazol foi realizado a fim de se observar quanto da amostra adicionada pode ser realmente detectada, mostrando desta maneira, a viabilidade da utilização do método para amostras reais. Assim, uma concentração conhecida do fármaco foi adicionada à solução do eletrólito suporte que, posteriormente, foi determinada através da equação da reta obtida na curva analítica para determinação de sulfametoxazol ($f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$ e $\Delta E_s=5\text{ mV}$). Os resultados obtidos para as determinações em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados dos ensaios de recuperação de sulfametoxazol em tampão BR (pH=6), sobre eletrodo de carbono vítreo, com $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$.

	Concentração 01	Concentração 02	Concentração 03
Valor real (mol L⁻¹)	1,01x10 ⁻⁴	2,88x10 ⁻⁴	3,61x10 ⁻⁴
Valore experimental médio (mol L⁻¹)	9,9x10 ⁻⁵	2,83x10 ⁻⁴	3,52x10 ⁻⁴
Desvio padrão (n=3)	3,46x10 ⁻⁶	5,86x10 ⁻⁶	6,03x10 ⁻⁶
Recuperação média	98,02%	98,38%	97,60%
DPR	3,5%	2,03%	1,67%

Fonte: A autora.

Os valores médios de recuperação (97,60% – 98,38%) estão próximos do valor teórico (100%), evidenciando a eficiência do método proposto para determinação de sulfametoxazol, e sugerindo que este procedimento possa ser aplicado em amostras reais.

4.1.6 Estudo da precisão

O estudo da precisão intra-corrida e precisão inter-corrida das medidas sobre eletrodo de carbono vítreo foi realizado adotando os procedimentos de limpeza descritos no item 3.3 da seção materiais e métodos. Para isto, realizou-se a limpeza do eletrodo, fez-se a medida do branco em eletrólito (tampão BR, pH 6,0), adicionou-se uma alíquota da solução estoque do fármaco (SMX= $2,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ ou TMP= $5,5 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$) fizeram-se 10 medidas de corrente, com agitação entre os ensaios para obtenção dos DPR da repetibilidade. Repetiu-se o procedimento descrito para medidas de corrente em soluções diferentes, durante 5 dias, para obtenção dos DPR da precisão inter-corrida. A Tabela 16 apresenta os desvios padrão relativo obtidos a partir deste estudo.

Tabela 16: Estudo da precisão das medidas sobre eletrodo de carbono vítreo em tampão BR, pH=6.

	Sulfametoxazol	Trimetoprima
Precisão intra-corrida		
DPR (n=10)	0,99%	1,23%
Precisão inter-corrida		
DPR (n=5)	2,28%	2,74%

Fonte: A autora.

Constatou-se que os desvios padrão relativo foram pequenos (inferiores a 5%) para

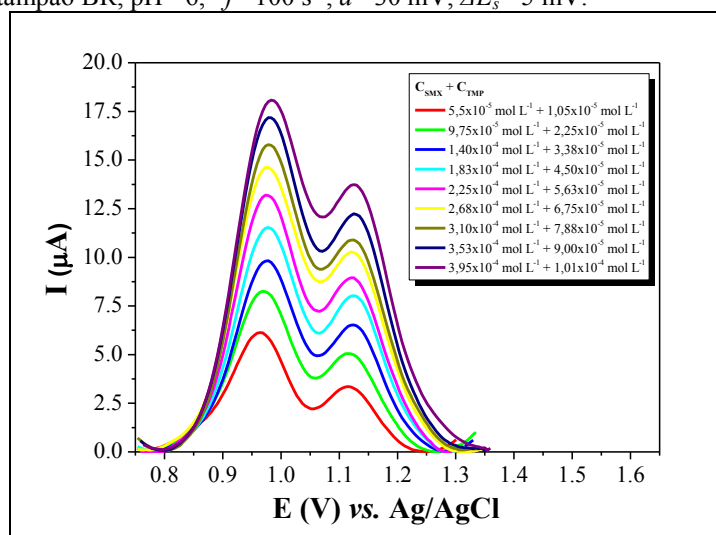
ambos os fármacos, o que denota uma boa precisão entre as medidas utilizando o procedimento de limpeza adotado.

4.1.7 Curva analítica para determinação simultânea de SMX e TMP

Como o intuito do método é a quantificação simultânea da associação sulfametoxazol e trimetoprima em amostras de medicamentos, construiu-se a curva analítica com ambos os fármacos, utilizando-se os parâmetros da otimização obtidos a partir do planejamento fatorial para determinação de trimetoprima ($f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$ e $\Delta E_s=5\text{ mV}$), já que está em menor proporção molar (proporção molar 5,74 SMX: 1 TMP) nas formulações farmacêuticas.

Realizaram-se medidas voltamétricas de onda quadrada no intervalo de potencial de 0,5 a 1,5V, adicionando-se alíquotas sucessivas da solução estoque dos analitos e polindo-se o eletrodo após cada varredura de potencial. A Figura 25 ilustra os voltamogramas obtidos variando-se a concentração de sulfametoxazol de $5,50 \times 10^{-5}$ a $3,95 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de trimetoprima de $1,05 \times 10^{-5}$ a $1,01 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$.

Figura 25: (A) Voltamogramas de onda quadrada para misturas de sulfametoxazol e trimetoprima sobre eletrodo de carbono vítreo em tampão BR, pH= 6, $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$.



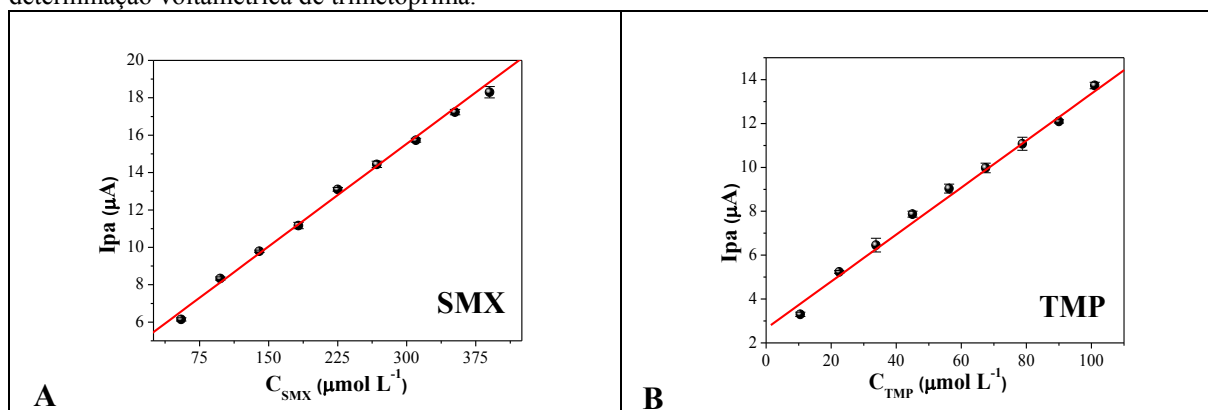
Fonte: A autora.

As curvas analíticas (n=3) construídas são apresentadas nas Figuras 26B e 26C, as equações da reta (10) e (11) e os coeficientes de correlação obtidos para SXM e TMP, respectivamente foram:

$$I_{pa} = 4,55 \times 10^{-6} + 0,0366 C_{SMX} \quad R = 0,9974 \quad (10)$$

$$I_{pa} = 2,66 \times 10^{-6} + 0,1070 C_{TMP} \quad R = 0,9971 \quad (11)$$

Figura 26: (A) Curva analítica para determinação voltamétrica de sulfametoxazol. (B) Curva analítica para determinação voltamétrica de trimetoprima.



Fonte: A autora.

Calculou-se os novos valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), seguindo-se os critérios definidos pela IUPAC^[97]. Assim, para sulfametoxazol os valores de LD e LQ foram: $8,52 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($2,16 \text{ mg L}^{-1}$) e $2,84 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($7,19 \text{ mg L}^{-1}$) enquanto que para trimetoprima foram: $9,31 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,27 \text{ mg L}^{-1}$) e $3,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,90 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente.

Apesar dos limites de detecção e quantificação terem sido maiores do que os relatados na literatura para a determinação simultânea de SMX e TMP^[37, 40, 51, 52], este fator não é tão relevante na determinação em medicamentos, devido à alta concentração dos fármacos em formulações farmacêuticas^[110]. Além disso, pode-se destacar que o eletrodo de carbono vítreo pode ser adquirido facilmente no comércio, apresentando baixo custo e simplicidade, permitindo a determinação simultânea dos fármacos sem a necessidade de nenhum tipo de modificação.

4.1.8 Ensaios de recuperação simultânea de SMX e TMP

Adicionalmente, realizaram-se ensaios de recuperação ($n=5$) em eletrólito, pelo método de calibração externa, para avaliar a viabilidade do método convencional na quantificação simultânea dos analitos. Deste modo, concentrações conhecidas de sulfametoxazol ($3,43 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e trimetoprima ($5,98 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionadas à solução do eletrólito suporte (tampão BR, pH 6,0) e posteriormente determinadas pela

aplicação nas equações das retas obtidas pelas curvas analíticas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados da recuperação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão BR (pH=6), $f=100\text{ s}^{-1}$, $a=30\text{ mV}$, $\Delta E_s=5\text{ mV}$.

	SMX	TMP
<i>Valor real</i>	$3,43 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$	$5,98 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$
<i>Valor experimental médio</i>	$3,42 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$	$5,95 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$
<i>Estimativa do desvio</i>	$8,08 \times 10^{-6}$	$1,33 \times 10^{-6}$
<i>Taxa de recuperação</i>	99,71%	99,50%
<i>DPR (n=5)</i>	2,36%	2,23%

Fonte: A autora.

As taxas de recuperação estão próximas ao valor teórico (100%) e os desvios padrão relativo foram inferiores a 5% para ambos os fármacos, o que denota uma boa exatidão e precisão, respectivamente. Os resultados revelam a viabilidade da aplicação da metodologia para quantificação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em medicamentos.

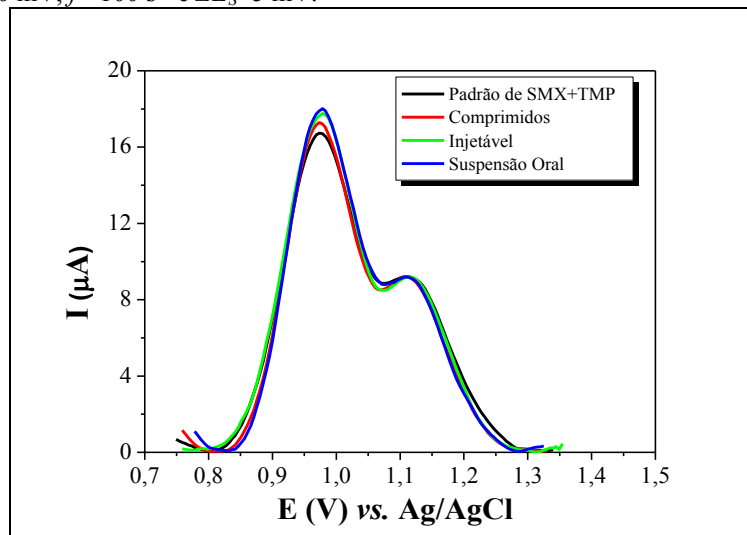
4.1.9 Análise de Amostras Reais

4.1.9.1 Interferentes

O efeito de possíveis interferentes na determinação simultânea dos fármacos pelo método proposto foi estimado pela análise dos perfis dos voltamogramas de onda quadrada obtidos nas diferentes formas de apresentação do produto farmacêutico (comprimidos, suspensão oral e solução injetável) e da solução padrão de sulfametoxazol e trimetoprima.

Para concentrações similares de SMX/TMP em diferentes amostras comerciais e solução padrão dos analitos, foi possível observar (Figura 27) que os perfis voltamétricos são muito similares, tanto em relação ao comportamento do sinal quanto a sua intensidade. As pequenas diferenças de intensidade para o sinal de SMX devem ser decorrentes de pequenas diferenças de concentração entre as soluções. Em função destes aspectos, não há indícios de efeitos de matriz relevantes que possam impedir a determinação quantitativa simultânea de SMX/TMP em amostras comerciais.

Figura 27: Voltamogramas de onda quadrada para as diferentes amostras de medicamentos (comprimidos, suspensão oral e solução injetável) e padrão de SMX/TMP em tampão BR, pH=6 obtidos sobre eletrodo de carbono vítreo, $\alpha = 30 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E_S = 5 \text{ mV}$.



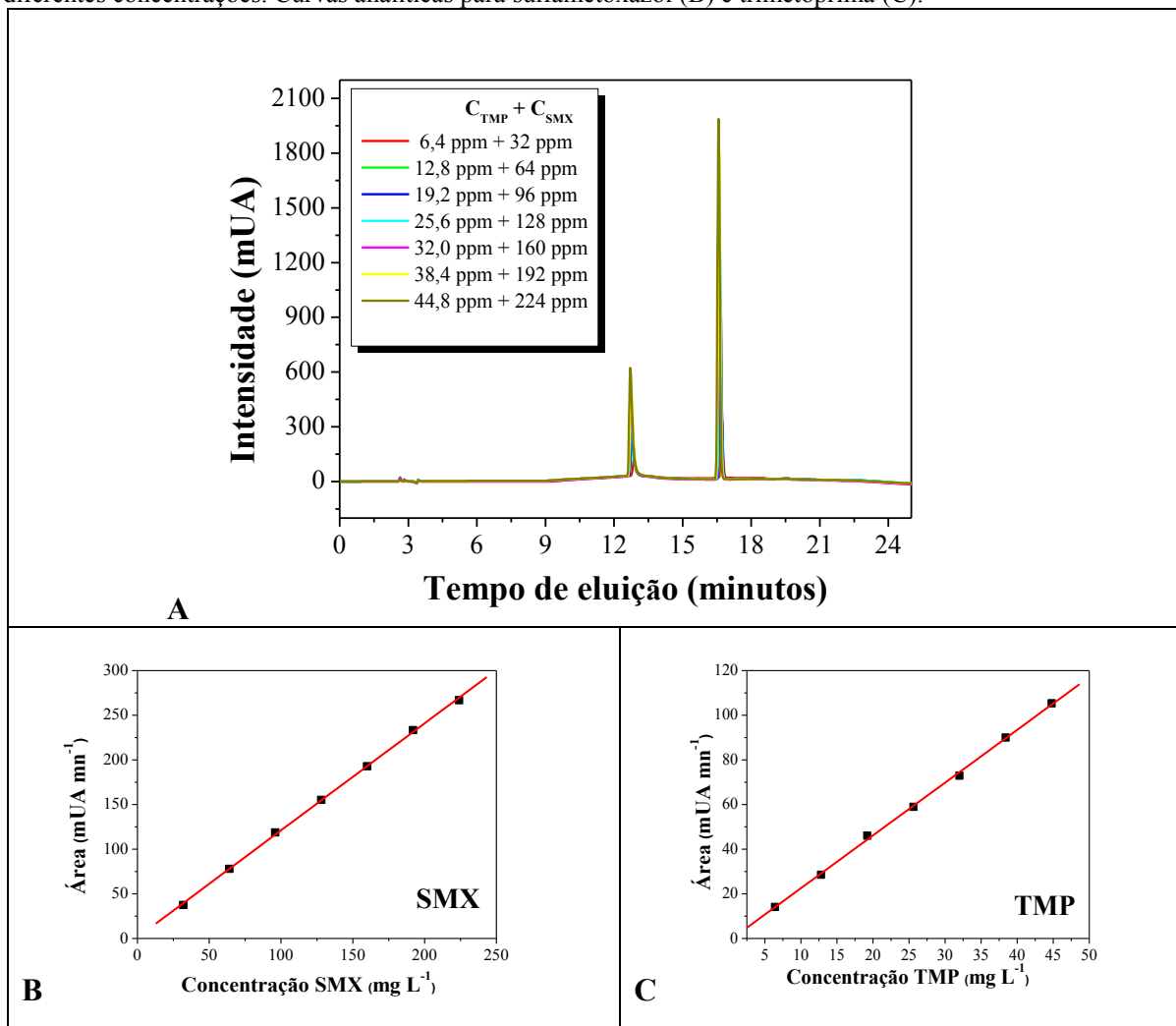
Fonte: A autora.

4.1.9.2 Determinação voltamétrica simultânea de SMX e TMP em amostras reais

O método voltamétrico utilizando eletrodo de carbono vítreo não modificado foi aplicado para a determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em seis amostras reais, incluindo as três diferentes formas de apresentação do medicamento (comprimidos, suspensão oral e solução injetável), sem a necessidade de nenhum pré-tratamento da amostra, como, separação, filtração, derivatização ou extração. Posteriormente, a Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foi utilizada para comparação e avaliação da exatidão do método proposto.

Nas condições experimentais empregadas, já descritas no item 3.6, o sulfametoxazol apresentou um tempo de retenção de 16,6 minutos e a trimetoprima um tempo de retenção de 12,87 minutos. Os cromatogramas típicos para a mistura de SMX ($\lambda = 268 \text{ nm}$) e TMP ($\lambda = 268 \text{ nm}$) obtidos variando-se a concentração de sulfametoxazol de 32 a 224 mg L^{-1} e a concentração de trimetoprima de 6,4 a 44,8 mg L^{-1} são apresentados na Figura 28A. As curvas analíticas são apresentadas nas Figuras 28B e 28C, as equações da obtidas para SMX (12) e TMP (13), respectivamente, são apresentadas a seguir.

Figura 28: (A) Cromatogramas (HPLC/DAD) obtidos para misturas de sulfametoxazol e trimetoprima em diferentes concentrações. Curvas analíticas para sulfametoxazol (B) e trimetoprima (C).



Fonte: A autora.

$$A = -1,0986 + 2,3634C_{TMP}, R=0,9995 \quad (12)$$

$$A = 1,2977 + 1,1981C_{SMX}, R=0,9997 \quad (13)$$

Na Tabela 18 encontram-se os resultados obtidos para a determinação simultânea dos fármacos em amostras de produto farmacêutico (comprimidos, suspensão oral e solução injetável) empregando o método proposto (VOQ) e o método oficial recomendado pela farmacopeia americana^[42] (HPLC), os resultados foram estatisticamente comparados aplicando-se os testes *t* e *F*.

Tabela 18: Resultados da determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em diferentes amostras de medicamentos, utilizando-se o método oficial (HPLC) e o método proposto (VOQ).

SMX / TMP							
Amostras	Valor nominal	HPLC ^a (mg)	VOQ ^a (mg)	DPR - VOQ (n=3) (%)	Teste <i>F</i> ^b	Teste <i>t</i> ^c	Erro relativo ^d (%)
01 injetável	400mg/80mg	414,45/80,99	417,51/79,29	3,79/1,37	3,17/4,06	0,29/1,93	0,74/-2,09
02 injetável	400mg/80mg	425,04/80,36	433,34/81,20	2,56/2,07	10,06/16,03	1,19/1,65	1,95/1,03
03 comprimidos	400mg/80mg	414,41/79,30	403,87/80,84	2,68/1,72	3,69/1,06	1,49/1,38	-2,54/1,94
04 comprimidos	400mg/80mg	380,48/78,11	382,13/80,58	3,53/2,41	1,31/15,04	0,14/2,12	0,43/3,16
05 suspensão oral	200mg/40mg	216,80/39,60	218,42/39,60	1,53/3,41	10,90/4,06	0,24/1,07	0,75/0
06 suspensão oral	200mg/40mg	204,48/41,92	218,69/43,56	2,88/4,73	6,93/3,05	1,48/1,68	6,94/3,91

^amédia de 3 análises

^b Valor crítico de *F* para 2,2 graus de liberdade ao nível de 95% de confiança = 19,00.

^c Valor crítico de *t* para 4 graus de liberdade ao nível de 95% de confiança = 2,78.

^d Erro Relativo (%): [(Valor experimental pela VOQ – valor experimental pelo HPLC)/ valor experimental pelo HPLC]x100.

Fonte: A autora.

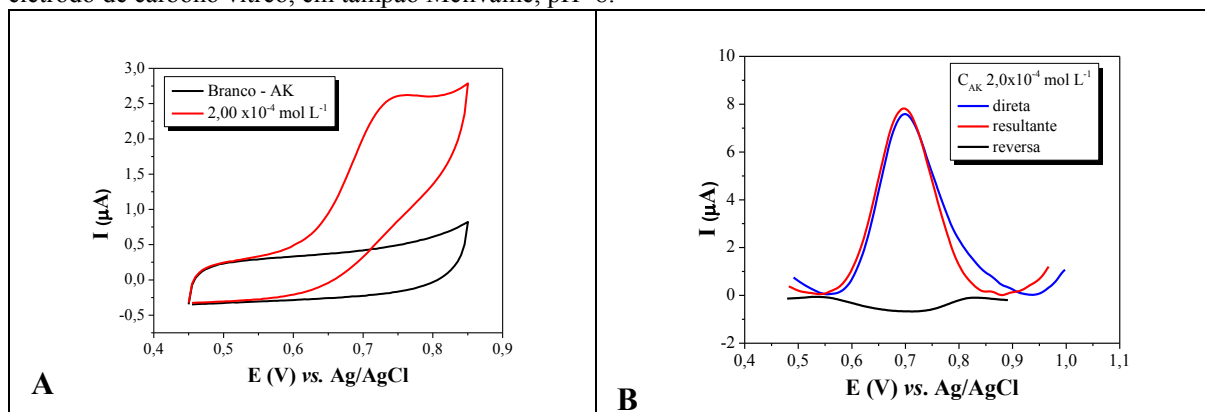
A precisão e a concentração prevista pelo método proposto foram comparadas ao método de referência (HPLC) pela análise estatística dos valores obtidos através do teste F e t , respectivamente. Conforme pode ser observado, os valores de F e t calculados para ambos os analitos, em todas as determinações foram inferiores aos valores tabelados de $F_{\text{crítico}}$ (19,00) e $t_{\text{crítico}}=2,78$ ($\alpha=0,05$), indicando que não há diferença significativa entre os resultados em um nível de confiança de 95%. Desta forma, o método voltamétrico proposto empregando a VOQ e o eletrodo de carbono vítreo não modificado mostrou-se simples, rápido e eficiente podendo ser utilizado para a determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em diferentes formas farmacêuticas.

4.2 Associação Ácido Kójico e Hidroquinona

4.2.1 Comportamento voltamétrico do ácido kójico sobre ECV

O comportamento voltamétrico do ácido kójico foi estudado sobre eletrodo de carbono vítreo em tampão McIlvaine pH= 8, na faixa de potencial de 0,45 a 0,85 V (Figura 26A). Nesta figura é possível observar que o ácido kójico apresenta somente um pico de oxidação irreversível em aproximadamente 0,72V vs. Ag/AgCl. Na Figura 26B, a irreversibilidade do processo é confirmada, pois na análise das componentes de corrente da voltametria de onda quadrada, a corrente resultante é bastante semelhante à direta e a corrente reversa não apresenta pico.

Figura 29: (A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido kójico a $v=50$ mV s⁻¹ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido kójico, $f=100$ s⁻¹, $a=30$ mV, $\Delta E_s=5$ mV sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH=8.

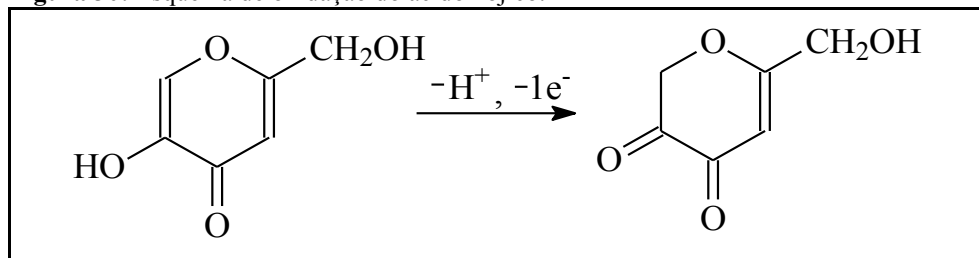


Fonte: A autora.

Segundo descrito na literatura^[60, 111], o ácido kójico é eletroquimicamente oxidado no

grupo hidroxila do anel, envolvendo a transferência de um elétron e um próton, conforme esquema apresentado na Figura 30.

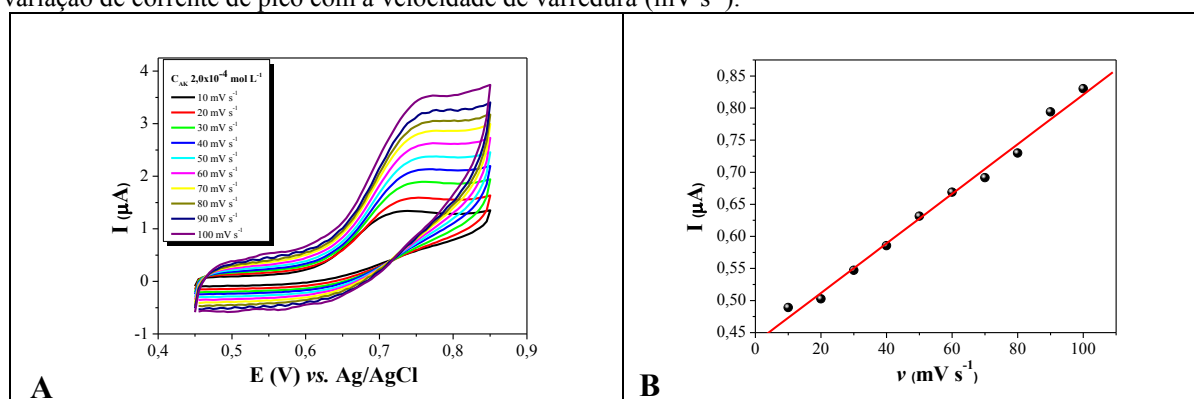
Figura 30: Esquema de oxidação do ácido kójico.



Fonte: Adaptado de [60].

Na Figura 31A são apresentados os voltamogramas em diferentes velocidades de varredura (de 10 a 100 mV) para uma concentração fixa de ácido kójico ($2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Observou-se que a corrente de pico anódica varia linearmente com a velocidade de varredura de potencial ($R = 0,9961$) (Figura 31B), caracterizando um processo adsorptivo na superfície do eletrodo^[9], comportamento este, já observado por Shih e Zen^[68] em tampão Britton-Robinson (pH=10), sobre eletrodo de carbono vítreo impresso e por Yang e Zhang^[112] em tampão acetato pH=5, sobre eletrodo de pasta de negro de fumo de acetileno modificado com polivinilpirrolidona (PVP).

Figura 31: (A) Voltamogramas cíclicos de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido kójico em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s⁻¹) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH 8. (B) Dependência da variação de corrente de pico com a velocidade de varredura (mV s⁻¹).



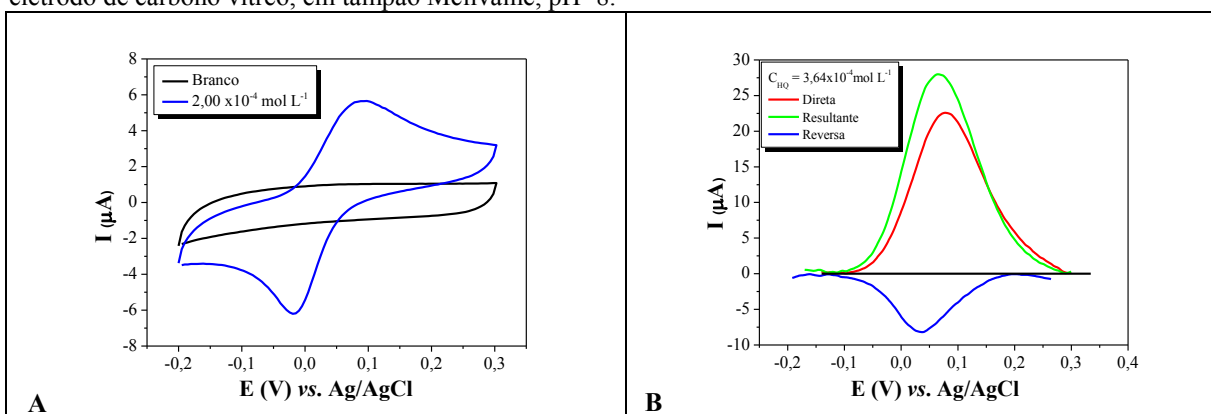
Fonte: A autora.

4.2.2 Comportamento voltamétrico da hidroquinona sobre ECV

Nos voltamogramas cíclicos, na faixa de potencial de -0,2 a +0,3 V, obtidos em tampão McIlvaine pH=8, sobre ECV (Figura 32A), observou-se que a hidroquinona apresenta

um processo quase-reversível com picos de oxidação em +0,08V e redução em -0,02 V vs. Ag/AgCl. A partir da análise das componentes de corrente da voltametria de onda quadrada, apresentada na Figura 29B, foi possível observar que a intensidade de corrente direta é maior que a corrente reversa, e ainda, que ocorre um pequeno deslocamento do potencial de redução para valores menos positivos. A presença de picos diretos e reversos com diferentes intensidades de correntes são características de processos redox quase-reversíveis^[113], corroborando com os dados observados através da voltametria cíclica. A corrente resultante foi utilizada para a determinação do método eletroanalítico, já que a mesma é dada pela soma dos módulos das correntes direta e reversa e, portanto, apresenta maior intensidade.

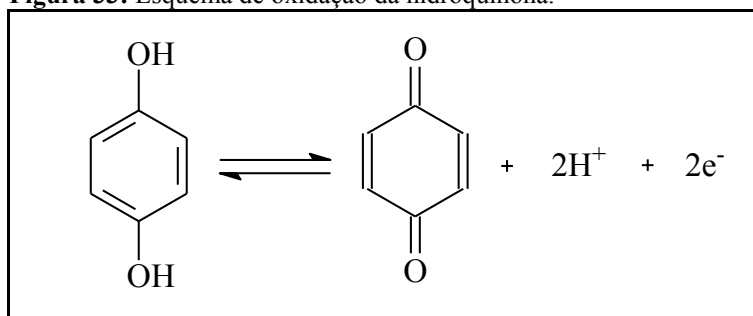
Figura 32: (A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroquinona a $v=50$ mV s⁻¹ (B) Voltamogramas de onda quadrada de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroquinona, $f=100$ s⁻¹, $a=30$ mV, $\Delta E_s=5$ mV sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH=8.



Fonte: A autora.

De acordo com estudos descritos na literatura, o processo redox da hidroquinona, envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons^[114, 115], seguindo o esquema apresentado na Figura 33.

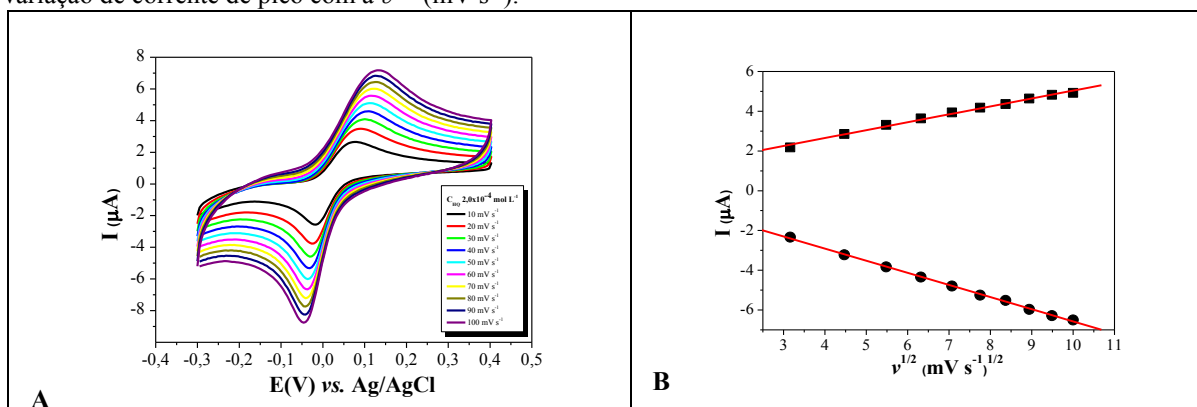
Figura 33: Esquema de oxidação da hidroquinona.



Fonte: [115].

Para caracterização do transporte de massa, a influência da velocidade de varredura de potencial foi investigada. Os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV) são apresentados na Figura 34A. Observou-se que as correntes de pico variam linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (oxidação, $R=0,9966$ e redução, $R=0,9994$) (Figura 34B). Essa relação de linearidade é um indicativo de que o sistema é controlado por difusão das espécies eletroativas^[9]. Este comportamento difusional também foi observado por Qi e Zhang^[115] em tampão acetato pH=4,5, sobre eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Figura 34: (A) Voltamogramas cíclicos de $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de hidroquinona em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s⁻¹) sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH 8. (B) Dependência da variação de corrente de pico com a $v^{1/2}$ (mV s⁻¹).



Fonte: A autora.

4.2.3 Influência do pH na resposta voltamétrica do AK e HQ

A influência do pH na resposta voltamétrica de $3,64 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de ácido kójico ou 3×10^{-4} mol L⁻¹ de hidroquinona, em 0,04 mol L⁻¹ de tampão BR, variando o pH de 2 a 8, foi avaliada. Neste estudo, observou-se que ambos os fármacos apresentaram resposta voltamétrica em toda a faixa de pH estudada, sendo a maior intensidade de corrente obtida nos pHs 8 e 2 para o AK e HQ, respectivamente (Figura 35). Embora em pH 8 a HQ não apresente o maior sinal de corrente, este pH foi utilizado para as demais análises em função de ser a melhor condição para a determinação de AK, uma vez que o objetivo do trabalho é determinar simultaneamente as duas espécies e este apresenta menor sensibilidade de corrente. No pH otimizado, outras soluções tampão, tais como, BR, McIlvaine, Fosfato de potássio - Hidróxido de sódio, Ácido bórico - Cloreto de Potássio^[99] foram testadas, sendo que a melhor resposta foi obtida em tampão McIlvaine, o qual foi escolhido para as demais

análises.

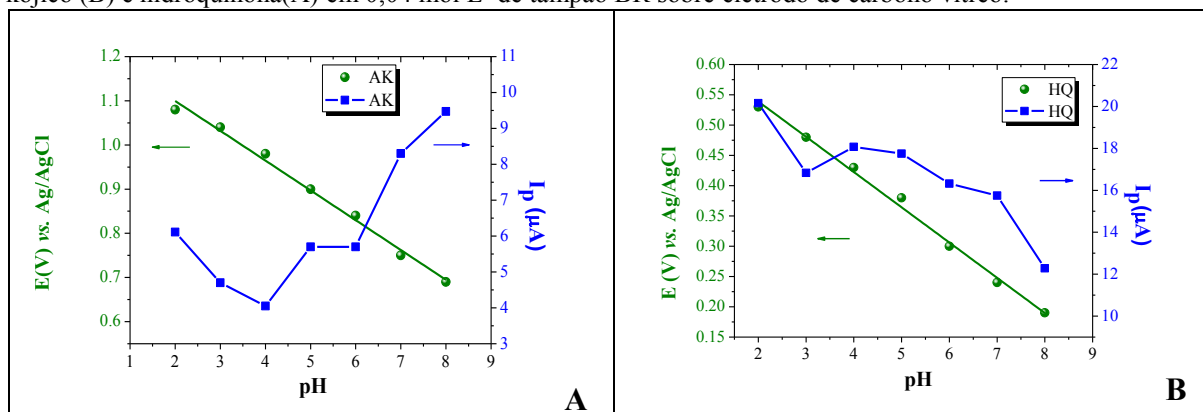
Adicionalmente, observou-se que os potenciais de pico de ambos os fármacos deslocam-se para valores menos positivos com o aumento do pH da solução, indicando que o processo redox é pH-dependente. Para o ácido kójico uma relação linear foi observada na faixa de pH estudada (Figura 35A), com inclinação de -68 mV pH^{-1} , o que sugere que o número de prótons e elétrons são iguais, confirmando que um próton participa da oxidação do fármaco, segundo o mecanismo apresentado na Figura 33, valor observado é muito próximo ao encontrado por Wang e colaboradores^[60] (62 mV pH^{-1}) em ECV modificado, Yang e Zhang^[112] (63 mV pH^{-1}) em EPC modificado e por Ma e Chao^[116] (66 mV pH^{-1}) em ECV modificado. A equação (14) representa a correlação entre o potencial de pico anódico e o pH do AK, onde os valores de potencial são dados em Volt.

$$E_p (\text{vs. Ag/AgCl}) = 1,235 - 0,068 \text{ pH}, R=0,9962 \quad (14)$$

Para a hidroquinona, também foi observada uma relação linear na faixa de pH de 2 a 8 (Figura 35B), com inclinação de -58 mV pH^{-1} , o valor encontrado, está próximo da inclinação nernstiana teórica de -59 mV pH^{-1} ^[108], corroborando o mecanismo apresentado na Figura 35, em que dois prótons e dois elétrons participam do processo redox. A equação (15) representa a correlação entre o potencial de pico anódico e o pH da HQ, onde os valores de potencial são dados em Volt.

$$E_p (\text{vs. Ag/AgCl}) = 0,655 - 0,058 \text{ pH}, R=0,9975 \quad (15)$$

Figura 35: Relação entre pH e potencial de pico (eixo y-esquerdo) e corrente de pico (eixo y-direito) para ácido kójico (B) e hidroquinona(A) em $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR sobre eletrodo de carbono vítreo.



Fonte: A autora.

4.2.4 Determinação individual de Ácido kójico

4.2.4.1 Otimização dos parâmetros da VOQ para determinação de AK

Para obter a melhor resposta analítica em termos de sensibilidade e seletividade para determinação individual de ácido kójico, os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada (f , a , ΔE_s) foram otimizados a partir de um planejamento fatorial completo 2^3 com quintuplicata do ponto central (para cálculo da estimativa do desvio padrão), e a resposta avaliada foi a razão entre a corrente de pico anódica (I_{pa}) e a largura de meia altura do pico de potencial ($\Delta E_{p/2}$). As variáveis e os níveis estudados foram: $f = 60 \text{ s}^{-1}$ (-1) e 80 s^{-1} (+1); $a = 20 \text{ mV}$ (-1) e 40 mV (+1) e $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$ (-1) e 3 mV (+1). Os resultados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados da otimização via planejamento fatorial 2^3 dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o ácido kójico.

Corrida	Variáveis			Resposta Corrente (μA) / Potencial (V)
	a	f	ΔE_s	
01	-	-	-	43,99
02	+	-	-	25,29
03	-	+	-	33,53
04	+	+	-	46,74
05	-	-	+	45,18
06	+	-	+	62,55
07	-	+	+	52,21
08	+	+	+	73,40
09	0	0	0	46,75
10	0	0	0	47,08
11	0	0	0	47,96
12	0	0	0	47,40
13	0	0	0	48,32

Fonte: A autora.

O tratamento estatístico dos resultados demonstrou que os todos os efeitos foram significativos com 95% de confiança ($0,64 \times 2,78 \text{ } t_{95\%, v=4} = 1,77$) para os valores de $I_{pa}/\Delta E_{p/2}$ (Tabela 20).

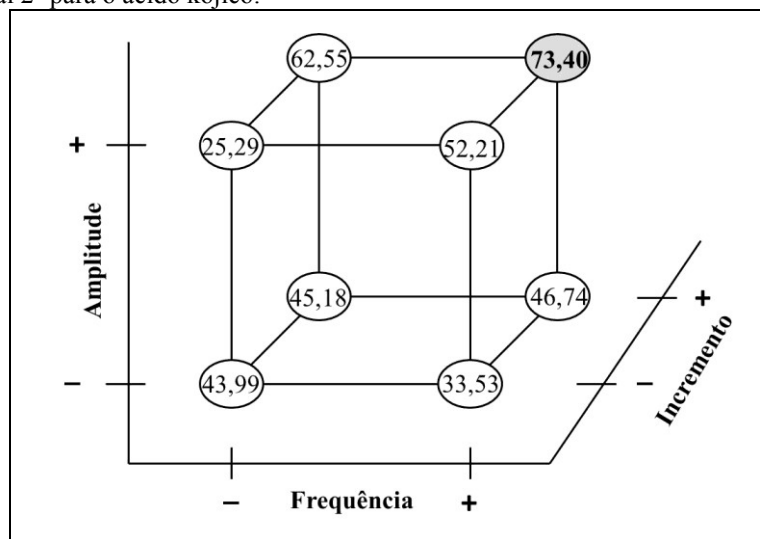
Tabela 20: Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para o ácido kójico, via planejamento fatorial completo 2^3 .

	Efeito Principal	Efeito de interação
Amplitude (a)	+8,27	-
Incremento (ΔE_s)	+20,95	-
Frequência (f)	+7,22	-
$a \times \Delta E_s$	-	+11,01
$a \times f$	-	+8,93
$f \times \Delta E_s$	-	+1,72
$a \times f \times \Delta E_s$	-	-7,02

Fonte: A autora.

Já que o efeito de interação de terceira ordem é significativo, a interpretação geométrica apresentada na Figura 34, evidencia as condições otimizadas para obtenção da melhor resposta na determinação de ácido kójico.

Figura 36: Interpretação geométrica do efeito de interação *amplitude vs. incremento vs. frequência* do planejamento fatorial 2^3 para o ácido kójico.



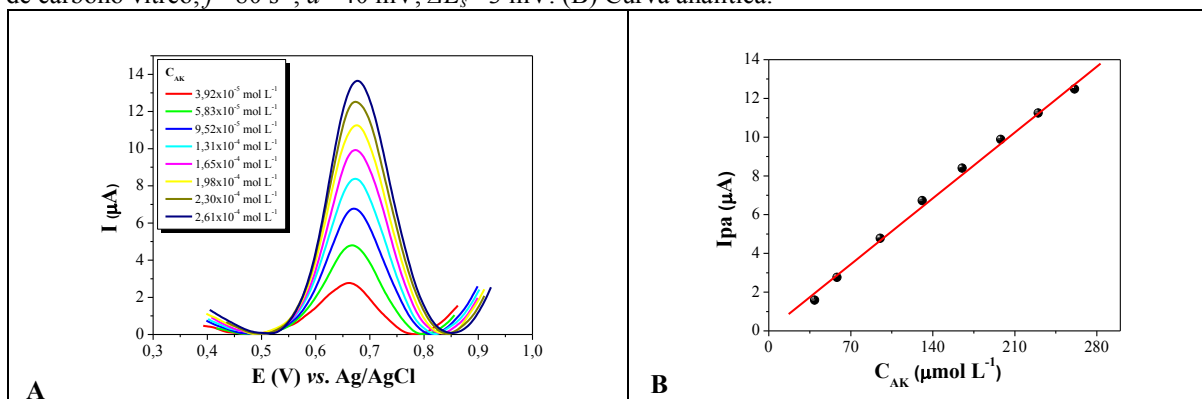
Fonte: A autora.

Nesta figura é possível observar que para qualquer um dos fatores estudados, há um aumento de corrente quando passamos do nível menor para o nível maior, sendo a melhor resposta em termos de sensibilidade e seletividade ($I_{pa} = 73,40 \mu A$) foi alcançada no vértice +++, ou seja, a $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$.

4.2.4.2 Curva analítica otimizada para determinação de AK

Com os parâmetros da voltametria de onda quadrada otimizados ($f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$), construiu-se curvas analíticas ($n=3$) pela adição de alíquotas da solução estoque de ácido kójico, no intervalo de concentração de $3,92 \times 10^{-5}$ a $2,61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A equação da reta obtida foi: $I_{pa} = 4,16 \times 10^{-8} + 0,0486 C_{AK}$ com coeficiente de correlação igual a 0,9986 (Figura 37).

Figura 37: (A) Voltamogramas de onda quadrada de ácido kójico, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f = 80 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

O aumento linear das correntes de pico anódica com o aumento da concentração do fármaco, possibilitou o cálculo dos limites de detecção e de quantificação^[97]. Assim, em eletrólito os valores de LD e LQ calculados foram $3,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,51 \text{ mg L}^{-1}$) e $1,19 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,69 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. Ao comparar os limites de detecção e quantificação obtidos para o AK sobre ECV com os reportados na literatura, pode-se constatar que o eletrodo utilizado possui LD um pouco acima do obtido por Yang e Zhang^[112], sobre eletrodo de pasta de negro de fumo de acetileno modificado com polivinilpirrolidona (PVP) ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e o obtido por Shih e Zen^[68], sobre eletrodo de carbono vítreo impresso ($0,17 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), entretanto, é importante salientar que o objetivo principal é a determinação de AK e HQ em amostras farmacêuticas, para qual o limite detecção obtido é adequado.

4.2.4.3 Ensaios de recuperação individual de AK

A fim de se observar quanto da amostra adicionada realmente pode ser detectada, realizou-se ensaios de recuperação de ácido kójico, pelo método de calibração externa, em

eletrólito suporte. Assim, uma concentração conhecida do fármaco foi adicionada à solução do eletrólito suporte que, posteriormente, foi determinada através da equação da reta obtida na curva analítica para determinação de AK ($f=80\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$ e $\Delta E_s=3\text{ mV}$). Os resultados obtidos para as determinações em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados da recuperação de ácido kójico sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine (pH=8), com $f=80\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=3\text{ mV}$.

	Concentração 01	Concentração 02	Concentração 03
Valor real (mol L⁻¹)	$6,40 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-4}$
Valore experimental médio (mol L⁻¹)	$6,36 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-4}$	$2,11 \times 10^{-4}$
Desvio padrão (n=3)	$2,50 \times 10^{-6}$	$2,00 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-6}$
Recuperação média	99,38%	102,76%	98,14%
DPR	3,93%	1,34%	0,47%

Fonte: A autora.

Os valores médios de recuperação (98,14% – 102,76%) estão próximos do valor teórico (100%), evidenciando a eficiência do método proposto para determinação de ácido kójico, e sugerindo que este procedimento possa ser aplicado em amostras reais.

4.2.5 Determinação individual de HQ e obtenção das condições otimizadas para análise simultânea dos clareadores

4.2.5.1 Otimização dos parâmetros instrumentais da VOQ

Com o objetivo de obter a melhor resposta analítica para a determinação de hidroquinona, e posterior determinação simultânea dos agentes despigmentantes, os parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada (f , a , ΔE_s) foram otimizados através de um planejamento fatorial completo 2^3 e a resposta avaliada foi a razão I_p e $\Delta E_{p/2}$. As variáveis e os níveis estudados foram: $f=20\text{ s}^{-1}$ (-1) e 40 s^{-1} (+1); $a=20\text{ mV}$ (-1) e 40 mV (+1) e $\Delta E_s=1\text{ mV}$ (-1) e 3 mV (+1). Os resultados são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Resultados da otimização via planejamento fatorial 2^3 dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para a hidroquinona.

Corrida	Variáveis			Resposta
	a	f	ΔE_s	Corrente (μA)/Potencial (V)
01	-	-	-	43,25
02	+	-	-	61,94
03	-	+	-	56,56
04	+	+	-	86,53
05	-	-	+	37,15
06	+	-	+	54,14
07	-	+	+	47,33
08	+	+	+	74,75
09	0	0	0	75,59
10	0	0	0	75,77
11	0	0	0	75,93
12	0	0	0	74,60
13	0	0	0	71,40

Fonte: A autora.

De acordo com o tratamento estatístico dos dados, os fatores que obtiveram efeito significativo com 95% de confiança ($1,89 \times 2,78 \ t_{95\%, v=4} = 5,25$) para os valores de $I_p/\Delta E_{p/2}$ foram: amplitude do pulso de potencial, frequência de aplicação de pulso de potencial e incremento de potencial, assim como a interação de segunda ordem entre a amplitude e a frequência (Tabela 23).

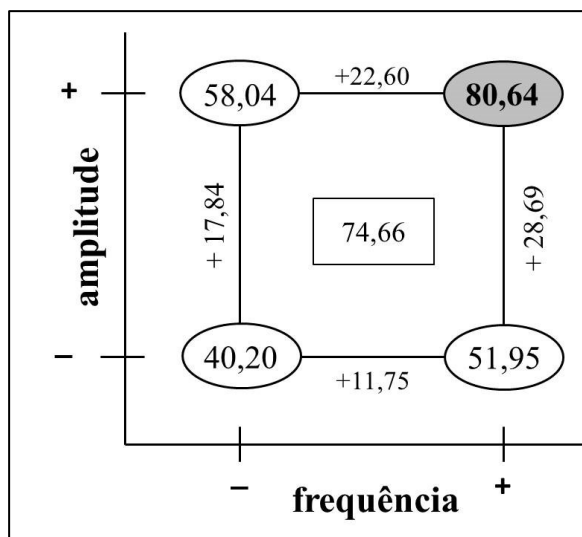
Tabela 23: Efeitos calculados para otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada para hidroquinona via planejamento fatorial completo 2^3 .

	Efeito Principal	Efeito de interação
Amplitude (a)	+23,27	-
Incremento (ΔE_s)	-8,73	-
Frequência (f)	+17,17	-
$a \times \Delta E_s$	-	-1,06
$a \times f$	-	5,43
$f \times \Delta E_s$	-	-1,78
$a \times \Delta E_s \times f$	-	-0,21

Fonte: A autora.

Para melhor visualização, a interpretação geométrica do efeito de interação de segunda ordem (amplitude $\times$ frequência) é apresentada na Figura 38.

Figura 38: Interpretação geométrica do efeito de interação *amplitude vs. frequência* do planejamento fatorial 2^3 para hidroquinona.



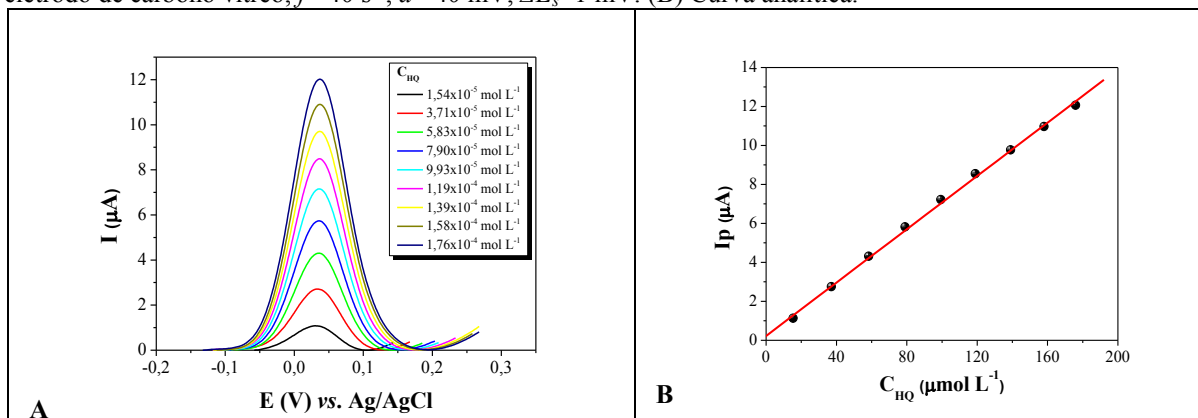
Pode-se concluir que para o incremento, a passagem do nível menor (–) para o nível maior (+) contribui para uma queda na resposta, enquanto que, para as variáveis amplitude e frequência, considerando a interação de segunda ordem, obtém-se a melhor resposta (80,64) quando se utiliza simultaneamente o nível (+) das duas variáveis.

Através da Figura 38, é possível observar que em uma menor frequência ocorre um aumento na corrente resultante de 17,84 quando se varia a amplitude do nível menor para o nível maior. No entanto, na maior frequência, um aumento muito mais significativo foi observado (28,69) quando se varia a amplitude. Isto evidencia que o efeito da frequência depende da amplitude utilizada. Assim, as condições otimizadas para determinação de hidroquinona foram: $f = 40 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$.

4.2.5.2 Curva analítica para determinação individual de HQ

Com os parâmetros da voltametria de onda quadrada otimizados ($f = 40 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$), três curvas analíticas foram construídas pela adição de pequenas alíquotas da solução estoque do fármaco. A Figura 39A mostra os voltamogramas obtidos na faixa de concentração de $1,54 \times 10^{-5}$ a $2,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona e a Figura 39B a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $I_p = 2,27 \times 10^{-7} + 0,0684 C_{\text{HQ}}$ com coeficiente de correlação igual a 0,9994.

Figura 39: (A) Voltamogramas de onda quadrada de hidroquinona, em tampão McIlvaine (pH= 8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f= 40 \text{ s}^{-1}$, $a= 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s=1 \text{ mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

A partir desses resultados, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados^[97]. Portanto, em eletrólito, os valores de LD e LQ calculados foram $1,47 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,16 \text{ mg L}^{-1}$) e $4,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,54 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente. O valor do limite de detecção obtido para a HQ sobre eletrodo de carbono vítreo é comparável aos obtidos por Ma e Zhao^[117] para o eletrodo de carbono líquido iônico dopado com grafeno ($1,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e Wang e colaboradores^[118] para eletrodo de carbono vítreo modificado com poliglicina ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

4.2.5.3 Ensaios de recuperação individual de HQ

Realizou-se ensaios de recuperação, em eletrólito suporte (tampão McIlvaine, pH=8), pelo método de calibração externa. Para tal, uma concentração conhecida de hidroquinona foi adicionada à solução do eletrólito suporte que, posteriormente, foi determinada através da equação da reta obtida na curva analítica individual ($f= 40 \text{ s}^{-1}$, $a= 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s= 1 \text{ mV}$). Os resultados obtidos para as determinações em diferentes concentrações são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Resultados do ensaio de recuperação para determinação individual de hidroquinona sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine (pH=8), $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$.

	Concentração 01	Concentração 02	Concentração 03
Valor real (mol L⁻¹)	$4,70 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{-4}$
Valor experimental médio (mol L⁻¹)	$4,62 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-4}$	$1,56 \times 10^{-4}$
Desvio padrão (n=3)	$1,57 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-6}$	1×10^{-6}
Recuperação média	98,30%	101,00%	97,5%
DPR	3,40%	1,09%	0,64%

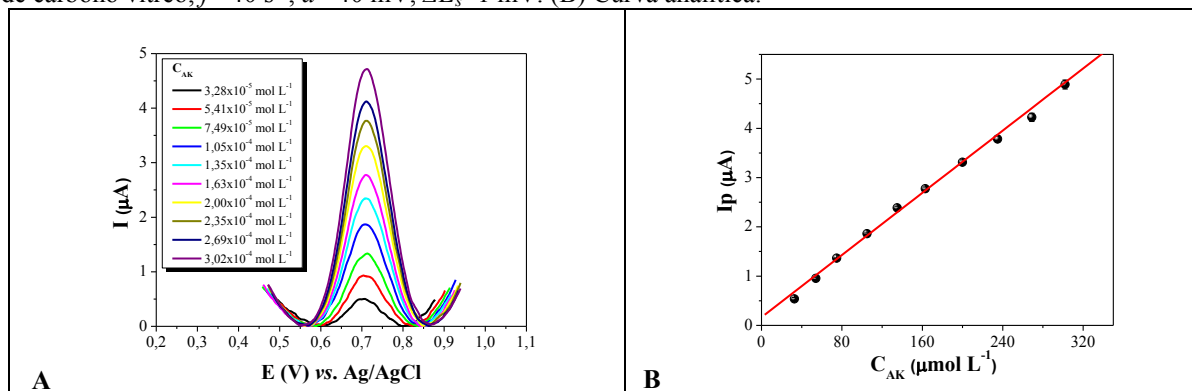
Fonte: A autora.

Os valores médios de recuperação estão próximos do valor teórico (100%), evidenciando a eficiência da metodologia proposta para determinação individual de hidroquinona, os bons valores de recuperação juntamente com os baixos valores de DPR, sugerem a aplicabilidade do método em amostras reais.

4.2.5.4 Curva analítica para AK nas condições para análise simultânea

Com os parâmetros da voltametria de onda quadrada estabelecidos ($f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$ e $\Delta E_s=1\text{ mV}$, novas curvas analíticas para o ácido kójico foram construídas. A Figura 38A mostra os voltamogramas obtidos na faixa de concentração de $3,28 \times 10^{-5}$ a $3,02 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ de AK e a Figura 40B a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $I_{pa}=1,66 \times 10^{-7}+0,0158\text{ C}_{AK}$ com coeficiente de correlação igual a 0,9956. Ao comparar a equação, com a obtida anteriormente para o AK (em suas condições otimizadas) é possível observar que, mesmo em faixas de concentrações semelhantes, houve perda de sensibilidade superior a 30%, este fato era esperado uma vez que dos parâmetros da VOQ para determinação de HQ são muito diferentes dos obtidos para determinação individual de AK ($f=80\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$ e $\Delta E_s=3\text{ mV}$), principalmente no que diz respeito a velocidade efetiva ($f \times \Delta E_s$).

Figura 40: (A) Voltamogramas de onda quadrada de ácido kójico, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$. (B) Curva analítica.

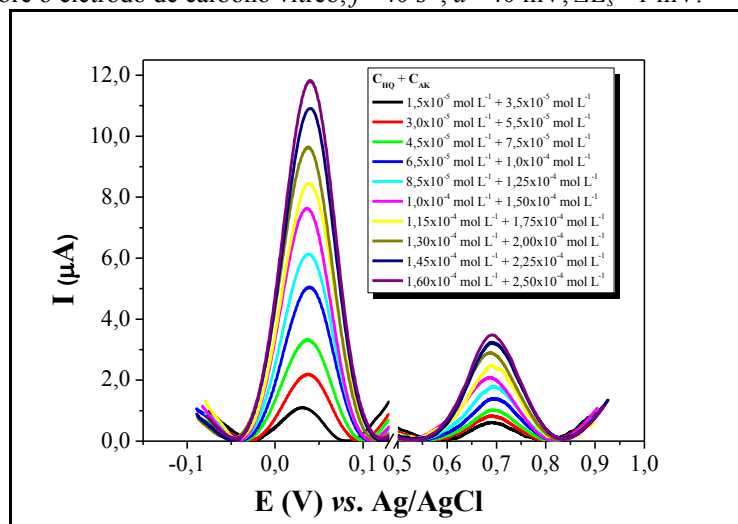


Fonte: A autora.

4.2.6 Curva analítica para determinação simultânea de AK e HQ

Considerando que o objetivo do presente trabalho é desenvolver um método analítico que permita a quantificação simultânea dos agentes despigmentantes em amostras de clareadores, construiu-se a curva analítica, polindo-se o eletrodo após cada varredura de potencial, utilizando-se os parâmetros da otimização obtidos a partir do planejamento fatorial da hidroquinona ($f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$ e $\Delta E_s=1\text{ mV}$), uma vez que não foi possível construir nas condições do AK (o que seria mais adequado, já que a sensibilidade para sua determinação é menor), em função do comportamento não linear da HQ em tais condições. A Figura 41A ilustra os voltamogramas de onda quadrada obtidos variando-se a concentração de hidroquinona de $1,5 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e a concentração de ácido kójico de $3,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Figura 41: (A) voltamogramas de onda quadrada para misturas de hidroquinona e ácido kójico em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre o eletrodo de carbono vítreo, $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$.



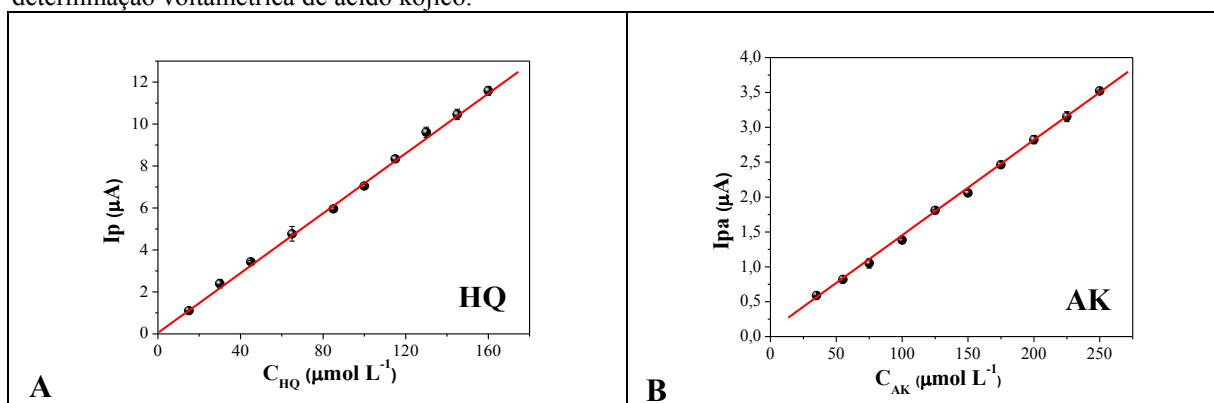
Fonte: A autora.

As curvas analíticas (n=3) construídas são apresentadas nas Figuras 42A e 42B, as equações da reta, e os coeficientes de correlação obtidos para HQ e AK, respectivamente foram:

$$I_p = 4,52 \times 10^{-8} + 0,0713 C_{HQ} \quad R = 0,9994 \quad (16)$$

$$I_p = 8,71 \times 10^{-8} + 0,0137 C_{AK} \quad R = 0,9996 \quad (17)$$

Figura 42: (A) Curva analítica para determinação voltamétrica de hidroquinona. (B) Curva analítica para determinação voltamétrica de ácido kójico.



Fonte: A autora.

4.2.7 Ensaios de recuperação simultânea de AK e HQ

Posteriormente, realizaram-se ensaios de recuperação em eletrólito pelo método de calibração externa, para avaliar a viabilidade do método na quantificação simultânea dos agentes despigmentantes. Deste modo, três diferentes concentrações conhecidas de hidroquinona e ácido kójico foram adicionadas à solução do eletrólito suporte (tampão McIlvaine, pH= 8) e posteriormente determinadas pela aplicação nas equações das retas obtidas pelas curvas analíticas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Resultados da recuperação simultânea de hidroquinona e ácido kójico sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine (pH=8), $f=40\text{ s}^{-1}$, $a=40\text{ mV}$, $\Delta E_s=1\text{ mV}$.

	Concentração 01		Concentração 02		Concentração 03	
	HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK
Valor real (mol L⁻¹)	$1,5 \times 10^{-4}$	$7,00 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,20 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-4}$
Valor experimental médio (mol L⁻¹)	$1,52 \times 10^{-4}$	$6,96 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-4}$	$1,26 \times 10^{-4}$	$3,17 \times 10^{-5}$	$2,18 \times 10^{-4}$
Recuperação média	101,33%	99,43%	99,23%	96,92%	99,06%	101,40%
DPR (n=3)	3,15%	2,78%	2,37%	2,41%	2,51%	1,21%

Fonte: A autora.

Conforme é possível observar, as taxas de recuperação estão próximas ao valor teórico (100%) e os desvios padrão relativo foram inferiores a 5% para ambos os clareadores, o que denota uma boa exatidão e precisão, respectivamente. Os resultados revelam a viabilidade da aplicação da metodologia para quantificação simultânea de hidroquinona e ácido kójico em amostras de clareadores.

4.2.8 Validação do método voltamétrico para determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona

A validação de um método analítico assegura a credibilidade do mesmo em análises de rotina, e garante através de estudos experimentais, que o método sob investigação apresenta desempenho consistente para aquilo a que se destina, assegurando a confiabilidade dos resultados. Deste modo, o método voltamétrico desenvolvido para determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona foi validado sob os parâmetros analíticos: exatidão, especificidade, repetibilidade, precisão intermediária, linearidade, intervalo, limite de detecção e limite de quantificação^[93, 95].

4.2.8.1 Exatidão

A exatidão e a especificidade da metodologia foram avaliadas por meio de ensaios de recuperação em base gel e creme, onde quantidades conhecidas de ácido kójico e hidroquinona padrão foram adicionadas ao veículo e posteriormente determinadas para obtenção das taxas de recuperação. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados da determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona em amostras de clareadores (gel e creme) utilizando-se o método voltamétrico proposto.

<i>Amostra</i>	<i>Veículo</i>	<i>Concentração real</i> <i>% (m/m)</i>		<i>Concentração experimental^a</i> <i>% (m/m)</i>		<i>Taxa de recuperação^b</i> <i>(%)</i>		<i>DPR^c</i> <i>(n=3) %</i>		<i>Erro relativo^d</i> <i>(%)</i>	
		AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
01	Gel	1,02	2,00	1,02	1,92	100,00	96,00	2,62	1,67	0	-4
03	Gel	2,03	2,00	2,03	2,00	100,00	100,00	2,13	2,02	0	0
05	Gel	3,99	3,01	4,05	3,00	101,5	99,67	2,79	3,23	1,5	-0,33
02	Creme	0,99	2,01	1,02	2,01	103,03	100,00	2,38	1,15	3,03	0
04	Creme	2,00	1,98	1,97	2,00	98,50	101,01	2,97	2,52	-1,5	1,01
06	Creme	4,08	3,06	4,00	2,94	98,04	96,08	1,83	2,75	-1,96	-3,92

^aMédia de 3 análises^bDesvio Padrão relativo (%): $[\text{estimativa do desvio padrão} / \text{média}] \times 100$.^cTaxa de recuperação: $[\text{Concentração real} / \text{Concentração experimental}] \times 100$.^dErro Relativo (%): $[(\text{Concentração experimental} - \text{concentração real}) / \text{concentração real}] \times 100$.

Fonte: A autora.

Avaliando os resultados, observou-se que o método voltamétrico proposto mostrou exatidão e especificidade em relação à matriz (base gel e creme), com porcentagens de recuperação entre 98,04–103,03% (DPR= 1,83–2,97) para o ácido kójico e 96,08–101,01% (DPR= 1,15–3,23) para hidroquinona.

4.2.8.2 Especificidade

Na tentativa de retardar o processo oxidativo nas formulações farmacêuticas de clareadores, antioxidantes são utilizados como conservantes. Estas substâncias agem retardando este processo, evitando o escurecimento e a perda da ação despigmentante^[119].

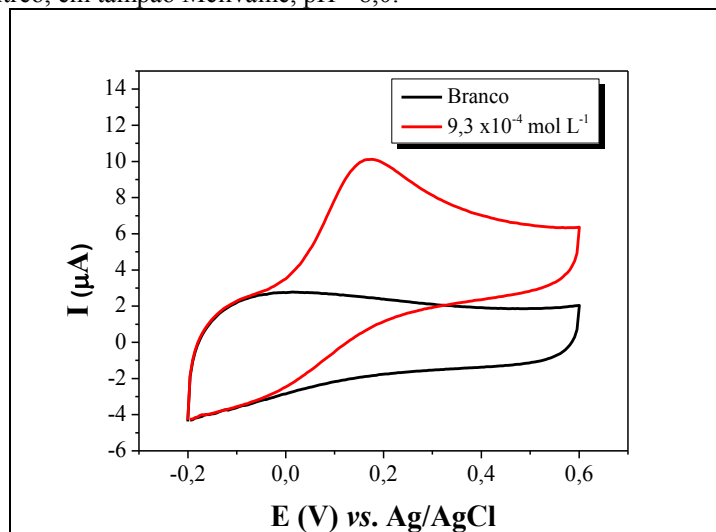
Existem diferentes tipos específicos de antioxidantes, a serem escolhidos de acordo com o sistema, para sistemas aquosos os mais utilizados são: sulfito de sódio, metabissulfito de sódio, ácido ascórbico (vitamina C) e derivados da cisteína. No caso de sistemas oleosos são: palmitato de ascorbila, butil-hidroxí-anisol (BHA), butil-hidroxí-tolueno (BHT), lecitina, vitamina E (alfa-tocoferol), propilgalato^[120]. Os antioxidantes podem agir sequestrando oxigênio ou interrompendo a reação em cadeia. Os removedores de oxigênio capturam o oxigênio do meio tornando-o indisponível para propagar a oxidação^[121]. Os sulfitos e o ácido ascórbico (vitamina C) são antioxidantes sequestradores de oxigênio eficazes para formas farmacêuticas contendo hidroquinona^[122].

O efeito de interferentes eletroativos em potencial na determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona em amostras de clareadores foi avaliado para dois antioxidantes solúveis em água, o ácido ascórbico (AA) e o metabissulfito de sódio (MTB) bastante utilizados em formulações que contenham hidroquinona.

4.2.8.2.1 Ácido Ascórbico

O perfil voltamétrico do ácido ascórbico foi avaliado sobre ECV em tampão McIlvaine (pH = 8), o voltamograma cíclico obtido é apresentado na Figura 43, onde foi possível observar que o AA apresenta um pico de oxidação em aproximadamente 0,16 V neste sistema. A oxidação eletroquímica do ácido ascórbico gera o ácido dehidroascórbico, com perda de dois elétrons^[123], embora esta oxidação seja reversível, o ácido dehidroascórbico gerado reage rapidamente com água tornando-se eletroquimicamente inativo^[124].

Figura 43: (A) Voltamogramas cíclicos para o branco e $9,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico a $v=50 \text{ mV s}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão Mcllvaine, pH= 8,0.

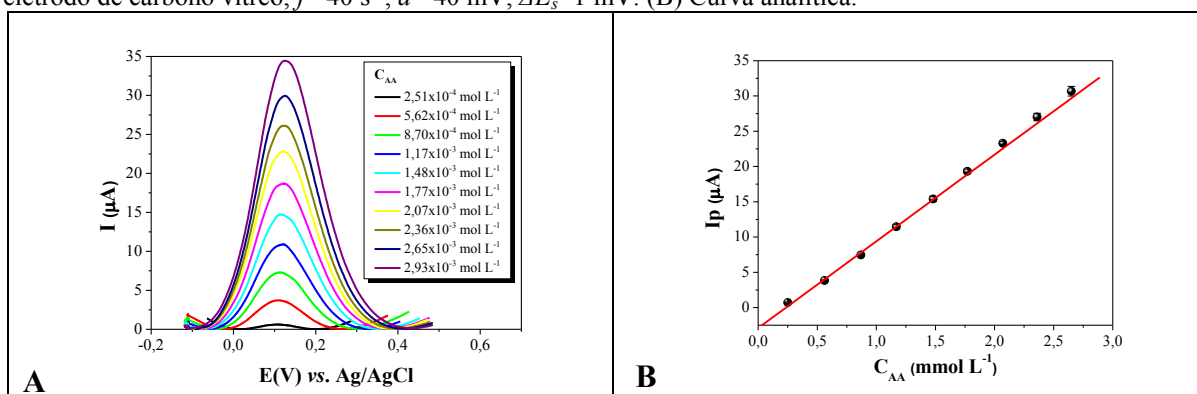


Fonte: A autora.

Empregando-se os parâmetros voltamétricos otimizados para quantificação simultânea de AK e HQ ($f=40 \text{ s}^{-1}$, $a=40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s=1 \text{ mV}$), curvas analíticas ($n=3$) foram construídas pela adição de pequenas alíquotas da solução estoque de ácido ascórbico. A Figura 44A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de concentração de $2,51 \times 10^{-4}$ a $2,93 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de AA e a Figura 44B a curva analítica. A equação da reta obtida foi: $I_{pa} = -2,90 \times 10^{-6} + 0,0123 C_{AA}$ com coeficiente de correlação igual a 0,9977.

Através dos voltamogramas de onda quadrada foi possível observar que, inconvenientemente, o potencial de oxidação do ácido ascórbico (0,12 V) é próximo ao da hidroquinona, evidenciando a possibilidade de interferência deste agente antioxidante na determinação de HQ em amostras reais de clareadores.

Figura 44: (A) Voltamogramas de onda quadrada de ácido ascórbico, em tampão Mcllvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40 \text{ s}^{-1}$, $a=40 \text{ mV}$, $\Delta E_s=1 \text{ mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

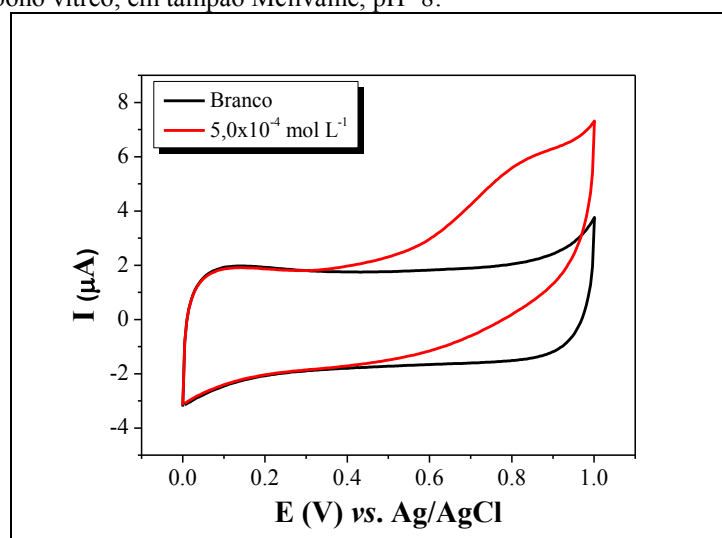
De acordo com a ANVISA^[93], os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o ácido ascórbico foram: $6,37 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($11,2 \text{ mg L}^{-1}$) e $2,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($37,4 \text{ mg L}^{-1}$).

Deste modo, podemos concluir que amostras reais contendo AA em quantidades inferiores ao LD, não configuram uma interferência significativa e o método desenvolvido poderá ser utilizado para a quantificação dos clareadores. Para farmácias de manipulação que utilizem quantidades de ácido ascórbico superiores a 1,1% (m/m), onde a concentração de AA na célula eletroquímica possa ultrapassar o LD, o método poderá apresentar erros significativos na quantificação de hidroquinona.

4.2.8.2.2 Metabissulfito de sódio

O perfil voltamétrico do metabissulfito de sódio (MTB) obtido através da voltametria cíclica é apresentado na Figura 45. Observou-se que o MTB apresenta um pico de oxidação irreversível^[125] em aproximadamente 0,75 V sobre eletrodo de carbono vítreo em tampão McIlvaine pH = 8,0.

Figura 45: Voltamogramas cíclicos para o branco e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de metabissulfito de sódio a $v=50 \text{ mV s}^{-1}$ sobre eletrodo de carbono vítreo, em tampão McIlvaine, pH=8.



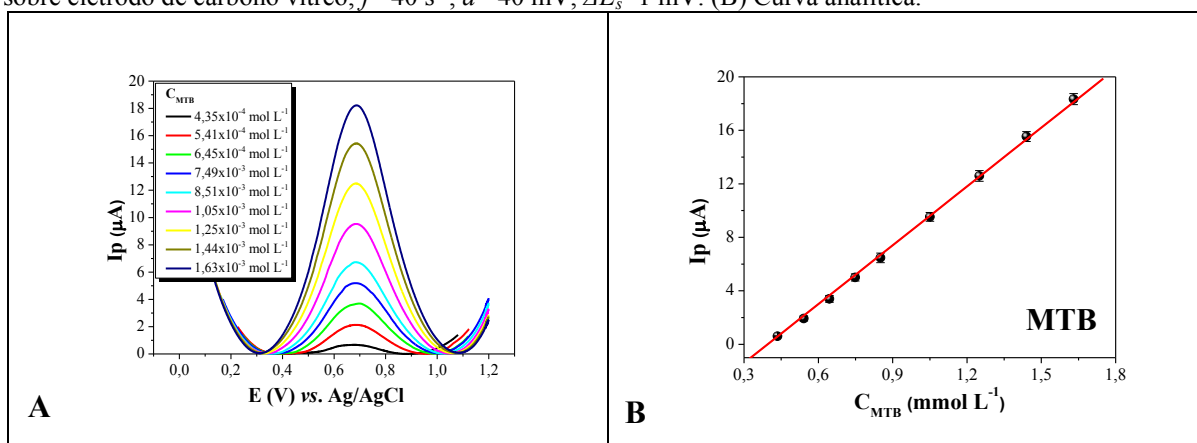
Fonte: A autora.

Sob os parâmetros voltamétricos otimizados ($f=40 \text{ s}^{-1}$, $a=40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s=1 \text{ mV}$), curvas analíticas ($n=3$) foram construídas pela adição de pequenas alíquotas da solução estoque de metabissulfito de sódio. A Figura 46A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos no intervalo de concentração de $4,35 \times 10^{-4}$ a $1,63 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de MTB, onde foi possível observar que o MTB é um possível interferente na determinação dos agentes

despigmentantes em amostras reais, uma vez que o seu potencial de oxidação (0,69 V) é muito próximo ao potencial de oxidação do ácido kójico.

Na Figura 46B a curva analítica é apresentada, a equação da reta obtida foi: $I_{pa} = -5,79 \times 10^{-6} + 0,0147 C_{MTB}$ com $R=0,9996$.

Figura 46: (A) Voltamogramas de onda quadrada de metabissulfito de sódio, em tampão McIlvaine (pH=8) sobre eletrodo de carbono vítreo, $f=40 \text{ s}^{-1}$, $a=40 \text{ mV}$, $\Delta E_s=1 \text{ mV}$. (B) Curva analítica.



Fonte: A autora.

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o metabissulfito de sódio, calculados seguindo os critérios da ANVISA^[93], foram: $6,80 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (12,9 mg L⁻¹) e $2,30 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (43,7 mg L⁻¹). Assim, é possível concluir que amostras reais contendo MTB em quantidades inferiores ao limite de detecção, não apresenta interferência significativa. Para farmácias de manipulação que utilizem metabissulfito de sódio em quantidade de superior a 1,28% (m/m), o método poderá apresentar erros significativos na quantificação de ácido kójico. Nas amostras reais analisadas, segundo informações do próprio fabricante, a concentração de MTB é de 10% da concentração de hidroquinona, ou seja, muito inferior ao limite de detecção do MTB.

4.2.8.3 Linearidade e Intervalo

O coeficiente de correlação linear (R) foi utilizado para avaliar a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito. Os coeficientes de correlação (ácido kójico, $R=0,9996$ e hidroquinona, $R=0,9994$) obtidos para os dois agentes despigmentantes em estudo foram bastante satisfatórios, uma vez que são superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método^[93]. O intervalo de concentração

estudado foi de $1,5 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para hidroquinona e de $3,5 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻⁴ para o ácido kójico.

4.2.8.4 Limite de Detecção e Quantificação

Seguindo-se os critérios definidos pela ANVISA^[93], os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados com base em parâmetros das curvas analíticas, de acordo com as equações abaixo:

$$LD = \frac{3 DP_a}{IC} \qquad LQ = \frac{10 DP_a}{IC}$$

Onde, DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y das curvas de calibração (n=3) e IC é a inclinação da curva de calibração. Deste modo, os valores de LD e LQ para hidroquinona foram: $3,71 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (0,41 mg L⁻¹) e $1,24 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (1,37 mg L⁻¹) enquanto que para o ácido kójico foram: $7,84 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (1,11 mg L⁻¹) e $2,61 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (3,71 mg L⁻¹), respectivamente.

Ao comparar os limites de detecção obtidos para a determinação simultânea de AK e HQ sobre eletrodo de carbono vítreo com os reportados na literatura para outras técnicas (uma vez que até o presente momento não foram encontrados relatos da determinação simultânea utilizando técnicas voltamétricas) pode-se constatar que o método proposto possui LDs menores que os obtidos por Lin e colaboradores^[82] empregando eletroforese capilar (AK: 7,1 mg L⁻¹ e HQ: 2,2 mg L⁻¹) e LQ e LD menores que Huang e colaboradores^[77] empregando HPLC (10mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹, respectivamente) no caso da hidroquinona.

4.2.8.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas) em três níveis de concentração e em triplicatas. Neste trabalho, este parâmetro analítico foi expresso na forma de coeficiente de variação (CV%). Os resultados obtidos no ensaio de repetibilidade são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27: Resultados do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrida).

	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03	
	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
Concentração (mol/L)	$5,00 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-4}$
Experimental	$4,69 \times 10^{-5}$	$2,55 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$
	$4,91 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$
	$4,84 \times 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$
Média (mol/L)	$4,81 \times 10^{-5}$	$2,64 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-4}$	$1,06 \times 10^{-4}$	$2,22 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-4}$
CV (%)	2,42	3,25	1,02	3,19	3,13	2,46

Fonte: A autora.

O ensaio de precisão intermediária foi realizado em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes, no mesmo laboratório e mesmos equipamentos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Resultados do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corrida).

	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03	
	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
Concentração (mol/L)	$5,00 \times 10^{-5}$	$2,50 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-4}$	$1,45 \times 10^{-4}$
Experimental Analista A	$4,69 \times 10^{-5}$	$2,55 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-4}$
	$4,91 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$2,23 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$
	$4,84 \times 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$	$9,77 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$
Experimental Analista B	$4,98 \times 10^{-5}$	$2,46 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-4}$	$2,05 \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$
	$4,84 \times 10^{-5}$	$2,62 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-4}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$2,24 \times 10^{-4}$	$1,41 \times 10^{-4}$
	$4,69 \times 10^{-5}$	$2,70 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-4}$	$9,77 \times 10^{-5}$	$2,18 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-4}$
Média (mol/L)	$4,83 \times 10^{-5}$	$2,62 \times 10^{-5}$	$1,49 \times 10^{-4}$	$1,03 \times 10^{-4}$	$2,19 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-4}$
CV (%)	2,42	3,72	2,17	3,75	3,73	2,93

Fonte: A autora.

Os CVs obtidos para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária foram comparados aos valores referenciados pela ANVISA^[93], sendo considerados satisfatórios, uma vez que todos os valores foram inferiores a 5%. Assim, a análise final permite afirmar que o método voltamétrico simultâneo desenvolvido para determinação de AK e HQ é

preciso, não somente quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas permanece constante mesmo com a mudança de algumas variáveis (dia e analista).

4.2.10 Análise de amostras reais

O método voltamétrico desenvolvido foi aplicado na determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona, em amostras de clareadores obtidas em farmácias de manipulação da região de Ponta Grossa/PR, incluindo os dois veículos gel de Natrosol® e creme Lanette®, e diferentes concentrações dos fármacos.

Para análise, uma quantidade adequada da amostra foi pesada e dissolvida em água. Uma alíquota apropriada foi diluída em solução tampão e posteriormente analisada, sendo que nenhum tipo de pré-tratamento de amostra foi necessário.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29: Resultados da determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona em amostras de clareadores (gel e creme) utilizando-se o método voltamétrico proposto.

<i>Amostra</i>	<i>Veículo</i>	<i>Origem</i>	<i>Concentração declarada</i> <i>% (m/m)</i>		<i>Concentração experimental^a</i> <i>% (m/m)</i>		<i>DPR^b</i> <i>(n=3) %</i>		<i>Erro relativo^c</i> <i>(%)</i>	
			AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
01	Gel	Manipulação A	2,00 %	2,00 %	2,11	2,15	2,96	3,11	5,5	7,5
02	Gel	Manipulação A	2,00 %	1,00 %	1,88	1,02	3,15	3,38	-6	2
03	Gel	Manipulação A	4,00 %	3,00 %	4,14	3,23	3,75	4,22	3,5	7,67
04	Creme	Manipulação A	2,00 %	2,00 %	1,98	2,20	3,99	3,78	-1	10
05	Creme	Manipulação A	1,00 %	2,00 %	1,11	1,87	3,57	4,48	11	-6,5
06	Gel	Manipulação B	2,00 %	2,00 %	2,06	2,11	4,66	4,74	3	5,5
07	Gel	Manipulação B	1,00 %	2,00 %	1,15	2,03	3,27	3,10	15	1,5
08	Creme	Manipulação B	2,00 %	2,00 %	1,84	2,26	3,17	4,13	-8	13

^amédia de 3 análises^bDesvio Padrão relativo (%): $[\text{estimativa do desvio padrão} / \text{média}] \times 100$.^cErro Relativo (%): $[(\text{Concentração experimental} - \text{concentração declarada}) / \text{concentração declarada}] \times 100$.

Fonte: A autora.

Conforme pode ser observado na Tabela 29, os valores de erro relativo variam de 1 a 15% para o ácido kójico e de 1,5 a 13% para hidroquinona. Os valores de erro relativo superiores a 5% podem estar relacionados com a falta de homogeneidade das amostras de clareadores, já que para esta análise foi retirada uma pequena alíquota da amostra para dissolução e diluição; ou ainda podem evidenciar a grande necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso a estes estabelecimentos.

Os valores dos desvios padrão relativo, por sua vez, foram inferiores a 5% para ambos os agentes despigmentantes, o que evidencia a boa precisão do método na determinação simultânea dos fármacos em amostras reais e corrobora a promissora utilização do método voltamétrico para o controle de qualidade deste tipo de amostra.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a voltametria de onda quadrada associada ao planejamento fatorial e o uso de eletrodo de carbono vítreo mostrou-se um método analítico simples, econômico e eficiente para a determinação de duas associações farmacêuticas de reconhecida importância farmacológica e cosmeceutica.

O sulfametoxazol e trimetoprima apresentaram um pico de oxidação irreversível em 0,96V e 1,12V vs. Ag/AgCl, respectivamente. Ambos os fármacos apresentaram resposta voltamétrica em ampla faixa de pH, sendo o pH=6 escolhido para desenvolvimento do método. Em relação ao transporte de massa, o SMX é controlado por difusão de espécies na superfície do eletrodo, enquanto para a TMP, o processo é adsorptivo. Os parâmetros instrumentais ótimos da VOQ obtidos por planejamento fatorial 2^3 , cujos resultados além de serem obtidos em um menor tempo de análise, também possibilitaram avaliar as interações entre as variáveis e verificar os efeitos sinérgicos relacionados às respostas obtidas, sendo o melhor sinal analítico em termos de sensibilidade e seletividade alcançado foram $a = 30$ mV, $f = 100$ s⁻¹ e $\Delta E_s = 5$ mV. Por fim, o método voltamétrico desenvolvido mostrou-se satisfatório para quantificação simultânea dos antibióticos em diferentes formulações farmacêuticas (comprimidos, suspensão oral e solução injetável), com resultados estatisticamente similares (95% de confiança) aos obtidos pela técnica farmacopeica de referência (HPLC).

Para a outra associação de interesse, os estudos eletroquímicos evidenciaram a presença de um pico de oxidação irreversível em +0,7V para o ácido kójico, enquanto que para hidroquinona foi observado um processo quase-reversível, com picos de oxidação em 0,06V e redução em -0,02V. A variação da concentração hidrogeniônica do meio mostrou que ambos os agentes despigmentantes apresentam resposta voltamétrica no intervalo de pH de 2,0 a 8,0, sendo a resposta expressivamente maior para o AK em pH=8. O transporte de massa da hidroquinona é controlado por difusão de espécies na superfície do eletrodo, enquanto para o ácido kójico o processo é adsorptivo. Os parâmetros instrumentais da VOQ foram otimizados através de um planejamento fatorial 2^3 , sendo o melhor sinal analítico em termos de sensibilidade e seletividade para análise simultânea alcançado em $a = 40$ mV, $f = 40$ s⁻¹ e $\Delta E_s = 1$ mV. O método desenvolvido foi validado sob parâmetros analíticos de exatidão, especificidade precisão (repetibilidade e precisão intermediária), linearidade, intervalo, limite de detecção e limite de quantificação. Na análise de amostras reais, o método voltamétrico inédito desenvolvido mostrou-se satisfatório para quantificação simultânea dos

agentes despigmentantes em diferentes formulações de clareadores em base gel e creme na presença de conservantes ($[AA] < 11.2 \text{ mg L}^{-1}$ e $[MTB] < 12.9 \text{ mg L}^{-1}$).

O eletrodo de carbono vítreo não modificado forneceu boa sensibilidade e seletividade para quantificação de ambas as associações em diferentes matrizes farmacêuticas sem a necessidade de modificação da superfície ou qualquer pré-tratamento da amostra, tornando-se assim, uma excelente alternativa para controle de qualidade destas associações farmacêuticas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento deste trabalho permitiu evidenciar aspectos relevantes relativos à quantificação voltamétrica de fármacos na presença de interferentes eletroativos, os quais permitiram reconhecer necessidades que podem ser tema de trabalhos futuros. Dentre os principais podemos destacar:

- O emprego de pH bastante ácido ou agente surfactante, para minimizar ou eliminar a interferência dos conservantes comumente presente nas formulações farmacêuticas dos clareadores estudados.
- A utilização de métodos de calibração multivariada para resolução de problemas relacionados à sobreposição dos picos voltamétricos.
- Desenvolver um método voltamétrico para a determinação da associação dos antibióticos estudados em matrizes mais complexas, tais como, as biológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] GUPTA, V. K.; JAIN, R.; RADHAPYARI, K.; JADON, N.; AGARWAL, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals-A review. **Analytical Biochemistry**, v.408, p.179–196, 2011.
- [2] MARDEGAN, ANDREA. **Advanced Materials for Inorganic Pollutants Electroanalysis**. 2013, 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) - Universidade Ca' Foscari, Veneza, 2013.
- [3] SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; STANLEY, R.C. **Fundamentos da Química Analítica**, 8ª edição, São Paulo: Ed. Thomson, 2007.
- [4] DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A.; USLU, B. The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, v. 3, p. 56-73, 2010.
- [5] PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.
- [6] GUMUSTAS, M. e OZKAN, S. A. Electrochemical evaluation and determination of antiretroviral drug fosamprenavir using boron-doped diamond and glassy carbon electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 189-203, 2010.
- [7] SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.
- [8] CAVALHEIRO, E. T. G.; BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Bioelectroanalysis of pharmaceutical compounds. **Bioanalytical Reviews**, v. 4, p. 31-53, 2012.
- [9] BRETT, A. M. O. e BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**, Oxford: University Press, 1996.
- [10] WANG, J. **Analytical Electrochemistry**, 2ª edição, New Jersey: Wiley-VCH, 2000.
- [11] BARD, A. J. e FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**, 2ª edição, Toronto: John Wiley and Sons, 2001.
- [12] BROWNSON, D. A.; KAMPOURIS, D. K.; BANKS, C. E. Graphene electrochemistry: fundamental concepts through to prominent applications. **Chemical Society Reviews**; v. 41, n. 21, p. 6944-76, 2012.
- [13] BARD, A. J.; GYORGY, I.; SCHOLZ, F. **Electrochemical Dictionary**, Berlim: Springer, 2008.
- [14] RENJINI, JOSEPH. **Development of electrochemical sensors for various pharmaceuticals**. 2012, 227 f. Tese (Doutorado em Química) – Cochin University os Science and Technology, Kerala, 2012.
- [15] MIRCESKI, V.; GULABOSKI, R.; LOVRIC, M.; BOGESKI, I.; KAPPL, R.; HOTH, M. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. **Electroanalysis**, v. 25, n. 11, p. 2411–2422, 2013.
- [16] MIRCESKI, V.; KOMORSKY-LOVRIC, S.; MILIVOJ L. **Square Wave Voltammetry: Theory and Application**, Berlim: Springer, 2007.
- [17] MIRCESKI, V. e GULABOSKI, R. Recent Achievements in Square-Wave Voltammetry (A Review). **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 2014.
- [18] EISELE, A. P. P.; CLAUSEN, D. N.; TARLEY, C. R. T.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol, Caffeine and Orphenadrine in Pharmaceutical Formulations Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 25, n. 7, p. 1734- 1741, 2013.
- [19] DEROCO, P. B.; VICENTINI, F. C.; OLIVEIRA, G. G.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O.

-
- Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 719, p. 19–23, 2014.
- [20] TAJIK, S.; TAHER, M. A.; BEITOLLAHI, H. First report for simultaneous determination of methyl dopa and hydrochlorothiazide using a nanostructured based electrochemical sensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 704, p. 137–144, 2013.
- [21] DANTAS, A. N. S.; SOUZA, D. de; LIMA, J. E. S. de; NETO, P. L.; CORREIA, A. N. Voltammetric determination of ketoconazole using a polished silver solid amalgam electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 9083–9089, 2010.
- [22] JAIN, R. e VIKAS; Voltammetric determination of cefpirome at multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon sensor based electrode in bulk form and pharmaceutical formulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, p. 423–426, 2011.
- [23] FERRARI, P. E. e REZENDE, M. C. Carbono Polimérico: Processamento e Aplicação. **Polímeros**, v.8, n.4, p. 22-30, 1998.
- [24] McCREERY, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2646–2687, 2008.
- [25] HARRIS, P. J. F. Fullerene-related structure of commercial glassy carbons. **Philosophical Magazine**, v. 84, n. 29, p. 3159–3167, 2004.
- [26] Disponível em <<http://www.als-japan.com/1408.html>>. Acesso em 22 de janeiro de 2015.
- [27] BAS, B.; BUGAJNA, A.; JAKUBOWSKA, M.; RECZYNSKI, W.; SMALEC, A. The renewable glassy carbon annular band electrode in a highly sensitive normal pulse voltammetric determination of paracetamol with continuous wavelet transformation. **Electrochimica Acta**, v. 99, p. 190–197, 2013.
- [28] PONTIÉ, M.; THOUAND, G.; DE NARDI, F.; TAPSOBA, I.; LHERBETTE, S. Antipassivating Electrochemical Process of Glassy Carbon Electrode (GCE) Dedicated to the Oxidation of Nitrophenol Compounds. **Electroanalysis**, v. 23, n. 7, p. 1579 – 1584, 2011.
- [29] JAINN, R.; YADAV, R. K.; RATHER, J. A. Voltammetric quantitation of nitazoxanide by glassy carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n.6, p. 452–455, 2013.
- [30] BUORO, R. M.; DICULESCU, V. C.; LOPES, I. C.; SERRANO, S. H. P.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical Oxidation of Sulfasalazine at a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 26, p. 924-930, 2014.
- [31] BRAGA, O. C.; CAMPESTRINI, I.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A. Sulfadiazine Determination in Pharmaceuticals by Electrochemical Reduction on a Glassy Carbon Electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, 813-820, 2010.
- [32] BAGHERI, A. e HOSSEINI, H. Electrochemistry of raloxifene on glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical formulations and human plasma. **Bioelectrochemistry**, v. 88, p. 164–170, 2012.
- [33] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa , 1ª edição, Brasília - DF, 2010.
- [34] NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S. Simultaneous ultraviolet–spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 241-247, 2006.
- [35] CALAÇA, G. N.; PESSOA, C. A.; WOHNATH, K.; NAGATA, N. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry. **International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 9, p. 438-442, 2014.

-
- [36] SOUZA, C. D. S.; BRAGA, O. C.; VIEIRA, I. C.; SPINELLI, A.; Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, p. 66-73, 2008.
- [37] KOTOUCEK, M.; SKOPALOVÁ, J.; MICHALKOVÁ, D.; Electroanalytical study of salazosulfapyridine and biseptol components at the mercury electrode. *Analytica Chimica Acta*, v. 353, p. 61-69, 1997.
- [38] Brasil. Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, volume 2, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010, pp. 726 e 768.
- [39] BOREEN, A. L.; ARNOLD, W. A.; MCNEILL, K. Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 3933-3940, 2004.
- [40] ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; CASS, Q. B.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on a Boron-Doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 13, p.1475-1480, 2009.
- [41] CORDEIRO, G. A.; PERALTA-ZAMORA, P.; NAGATA, N.; PONTAROLLO, R. Determinação de misturas de sulfametoxazol e trimetoprima por espectroscopia eletrônica multivariada. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 254-260, 2008.
- [42] **United States Pharmacopeia 30** – National Formulary 25, USP, Rockville, MD, 2007, pp. 3247-3249.
- [43] LOPEZ-MARTINEZ, L.; LOPEZ-DE-ALBA, P. L.; LEO-RODRIGUEZ, L. M.; YEPEZMURRIETA, M. L. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulphamethoxypyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 77-85, 2002.
- [44] SHAMSA, F. e AMANI, L. Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Pharmaceuticals by Visible and UV Spectrophotometry. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 1, p. 31-36, 2006.
- [45] SAYAR, E.; SAHIN, S.; CEVHEROGLU, S.; HINCAL, A. A. Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in human plasma. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 35, n. 1-2, p.41-6, 2010.
- [46] AKAY, C.; OZKAN, S. A. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 4, p. 1207-1213, 2002.
- [47] KULIKOV, A. U.; VERUSHKIN, A. G.; LOGINOVA, L. P. Comparison of Micellar and Reversed-Phase Liquid Chromatography for Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim. **Chromatographia**, v. 61, n. 9-10, p. 455-463, 2005.
- [48] BERZAS NEVADO, J. J.; CASTANEDA PENALVO, G.; GUZMAN BERNARDO, F. J. Determination of sulfamethoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 205-210, 2001.
- [49] SILVA, I. S.; VIDAL, D. T. R.; LAGO, C. L.; ANGNES L. Fast simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 8, p.1405-1409, 2013.
- [50] FAN, L.; LIU, L.; CHEN, H.; CHEN, X.; HU, Z. Continuous on-line concentration based on dynamic pH junction for trimethoprim and sulfamethoxazole by microfluidic capillary electrophoresis combined with flow injection analysis system. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, n. 1, p. 133-137, 2005.
- [51] ANDRADE, L. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; CASS, Q. B.; FATIBELLO-FILHO, O. A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 2, p. 402-407, 2010.

-
- [52] CESARINO, I.; CESARINO, V.; LANZA, M.R.V. Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. **Sensors and Actuators B**, v. 188, p. 1293–1299, 2013.
- [53] GILLBRO J. M.; OLSSON, M. J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing and new approaches. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 3, p. 210–221, 2011.
- [54] MIOT, L. D. B; MIOT, H. A.; SILVA, M. G.; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623-635, 2009.
- [55] PARVEZ, S.; KANG, M.; CHUNG, H. S.; CHO, C.; HONG, M. C.; SHIN, M. K.; BAE, H. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 11, p. 921–934, 2006.
- [56] JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J.; **Histologia Básica**; 10ª edição; Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.
- [57] CHISVERT, A.; SISTERNES, J.; BALAGUER, A.; SALVADOR, A. A gas chromatography–mass spectrometric method to determine skin-whitening agents in cosmetic products. **Talanta**, v. 81, p. 530–536, 2010.
- [58] CHISVERT, A.; BALAGUER, A.; SALVADOR, A. **Analysis of Cosmetics Products: Tanning and Whitening Agents in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods**. Editora: Elsevier, p.128-140, 2007.
- [59] KATSAMBAS, A. D. e STRATIGOS, A. J. Depigmenting and Bleaching Agents: Coping with Hyperpigmentation. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 483-488, 2001.
- [60] WANG, Y.; ZHANG, D.; WU, J. Electrocatalytic oxidation of kojic acid at a reduced graphene sheet modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 664, p. 111-116, 2012.
- [61] PICARDO, M. e CARRERA, M.. New and Experimental Treatments of Cloasma and Other Hypermelanoses. **Dermatologic Clinics**, v. 25, p. 353-362, 2007.
- [62] BANDYOPADHYAY, D. Topical Treatment of Melasma. **Indian Journal of Dermatology**, v. 54, n. 4, p. 303-309, 2009.
- [63] RENDON, M.; BERNEBURG, M.; ARELLANO, I.; PICARDO, M. Treatment of melasma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 5, p. S272-S281, 2006.
- [64] CALAÇA, G. N.; STES, S.; NAGATA, N. Determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona por espectrofotometria visível e calibração multivariada. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 630-635, 2011.
- [65] LIM, J. T. E. Treatment of Melasma Using Kojic Acid in a Gel Containing Hydroquinone and Glycolic Acid. **Dermatologic Surgery**, v. 25, n.4, p. 282-284, 1999.
- [66] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº67 de 08 de outubro de 2007 que dispõe sobre: **Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias**. Brasília: Diário Oficial da União, 21 agosto, 2006.
- [67] FRANCO, D. C. Z.; CARVALHO, G. S. G. DE; ROCHA, P. R.; TEIXEIRA, R. S.; SILVA, A. D. DA; RAPOSO, N. R. B. Inhibitory Effects of Resveratrol Analogs on Mushroom Tyrosinase Activity. **Molecules**, v. 17, p. 11816-11825, 2012.
- [68] SHIH, Y. e ZEN, J. M. Voltammetric Determination of Kojic Acid in Cosmetic Bleaching Products Using a Screen-Printed Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 11, n. 4, p. 2229-233, 1999.
- [69] VIEIRA, I. C E FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin: graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v.52, p. 681–689, 2000.
- [70] OLIVEIRA, I. R. W. Z.; OSÓRIO, R. E. M. B.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on a

-
- novel copper complex for the determination of hydroquinone in cosmetics. **Sensors and Actuators B**, v. 122, p. 89–94, 2007.
- [71] ZHANG, Y. e ZHENG, J. B. Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 7210–7216, 2007.
- [72] WANG, Y.; TANG, J.; LUO, X.; HU, X.; YANG, C; XU, Q. Development of a sensitive and selective kojic acid sensor based on molecularly imprinted polymer modified electrode in the lab-on-valve system. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2522–2527, 2011.
- [73] HOSSEINI, M. G.; MOMENI, M. M.; FARAJI, M. Fabrication of Au-Nanoparticle/TiO₂-Nanotubes Electrodes Using Electrochemical Methods and Their Application for Electrocatalytic Oxidation of Hydroquinone. **Electroanalysis**, v. 23, n. 7, p. 1654-1662, 2011.
- [74] XU, G., LI, B.; LUO, X. Carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for the electrocatalytic oxidation and detection of hydroquinone. **Sensors and Actuators B**, v. 176, 2013, p. 69–74, 2013.
- [75] YANG, Z.; YIN, Z.; CHEN, F. A novel kojic acid amperometric sensor based on hollow CuO/Fe₂O₃ hybrid microspheres immobilized in chitosan matrix. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 1089–1093, 2011.
- [76] SAFITRI, A.; MULYASURYANI, A.; TRIANDI, T. Determination of Hydroquinone in a Square Wave Voltammetry Based on Screen Printed Carbon Electrode. **J. Pure App. Chem. Res.**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2015.
- [77] HUANG, S.C.; LIN C. C.; HUANG M. C.; WEN K. C. Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid, arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 12, p. 13-18, 2004.
- [78] LIN, C.H.; WU, H.L.; HUANG, Y.L. Combining high-performance liquid chromatography with on-line microdialysis sampling for the simultaneous determination of ascorbyl glucoside, kojic acid, and niacinamide in bleaching cosmetics. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, p. 102–107, 2007.
- [79] WANG, A. C.; CHENG, S. H.; SHEU, C.; KWAN, C. C. Simultaneous Determination of Five Whitening Agents by Ion-Pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 9, n. 4, p. 287-299, 2011.
- [80] DESMEDT, B.; ROGIERS, V.; COURSELLE, P.; DE BEER, J. O.; DE PAEPE, K.; DECONINCK, E. Development and validation of a fast chromatographic method for screening and quantification of legal and illegal skin whitening agents. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 82-88, 2013.
- [81] JIN, W.; WANG, W. Y. ; ZHANG, Y. L.; YANG, Y. J.; CHU, Q. C.; YE, J. N. Determination of phenolic whitening agents in cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography with amperometric detection. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, p. 636-638, 2013.
- [82] LIN, Y. H.; YANG, Y. H.; WU, S. M. Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 279-282, 2007.
- [83] SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de Métodos Quimiométricos em Análise de Solos. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 547-556, 2000.
- [84] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 1999.
- [85] SOUZA, A. M. E POPPI, R. J. Experimento Didático de Quimiometria para Análise Exploratória de Óleos Vegetais Comestíveis por Espectroscopia no Infravermelho Médio e Análise de Componentes Principais: Um Tutorial, Parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.
- [86] BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de Quimiometria para Planejamento de Experimentos: Avaliação das Condições Experimentais na Determinação Espectrofotométrica de Ferro II com o-Fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Química. Nova**, v. 37, n. 3, p.

-
- 564-573, 2014.
- [87] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**, 4ª edição, Porto Alegre: Bookman, 2010.
- [88] PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, n. 2, p. 106-110, 2005.
- [89] TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, W. N. L.; MATOS, G. D.; SILVA, E. G. P.; BEZERRA M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C.. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58–67, 2009.
- [90] BIA, G.; BORGNINO, L.; ORTIZ, P. I.; PFAFFEN, V. Multivariate optimization of square wave voltammetry using bismuthfilm electrode to determine atrazin. **Sensors and Actuators B**, v. 203, p. 396–405, 2014.
- [91] TEÓFILO, R. F.; REIS, E. L.; REIS, C.; SILVA, G. A.; KUBOTA, L. T. Experimental Design Employed to Square Wave Voltammetry Response Optimization for the Glyphosate Determination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 865-871, 2004.
- [92] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [93] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº899 de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: Diário Oficial da União, 02 fev, 2003.
- [94] GUMUSTAS, M. e OZKAN, S. A. The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. **The Open Analytical Chemistry Journal**, v. 5, p. 1-21, 2011.
- [95] International Conference on Harmonisation (ICH), **Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**, 2005.
- [96] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientação sobre Validação de Métodos**, DOQ-CGCRE-008, Revisão 03 – fev/2010.
- [97] MOCÁK, J.; BOND, A. M. MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 297-328, 1997.
- [98] BRITTON, H. T. S. e ROBINSON, R. A. Universal Buffer Solutions and the Dissociation Constant of Veronal. **Journal of the Chemical Society**, p.1456-1462, 1931.
- [99] MORITA, T. e ASSUMPCÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**, 2ª edição, São Paulo: Edgard Blucher, 1972.
- [100] MOMBERG A. V.; MARIA, E.; CARRERA, B.; DIETRICH, V. B.; CARLS, B. The oxidative voltammetric behaviour of some sulphonamides at the glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 159, p. 119-127, 1984.
- [101] JOSEPH, R.; KUMAR, K. G. Differential pulse voltammetric determination and catalytic oxidation of sulfamethoxazole using [5,10,15,20- tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy phenyl) porphyrinato] Cu (II) modified carbon paste sensor. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, p. 278–283, 2010.
- [102] SHIH, Y.; ZEN, J.; KUMAR, A. S.; CHEN, P. Flow injection analysis of zinc pyrithione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode, **Talanta**, v. 62, p. 912–917, 2004.
- [103] RAJITH, L.; JISSY, A. K.; KUMAR, K. G.; DATTA, A. Mechanistic Study for the Facile Oxidation of

-
- Trimethoprim on a Manganese Porphyrin Incorporated Glassy Carbon Electrode. **The Journal of Physical Chemistry C**, 115, 44, p. 21858–21864, 2011.
- [104] YANG, A. X. e JIN, G. D. Electrochemical oxidation and the voltammetric determination of trimethoprim. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, 2010.
- [105] GOYAL, R. N. e KUMAR, A. Mechanism of electrochemical oxidation of trimethoprim at pyrolytic graphite electrode. **Electroanalysis**, v. 2, p. 539-545, 1990.
- [106] RAJITH, L. e KUMAR, K. G. Electroanalysis of trimethoprim on metalloporphyrin incorporated glassy carbon electrode. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, n. 9, p. 436-441, 2010.
- [107] ARVAND, M.; ANSARI, R.; HEYDARI, L. Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 1819–1825, 2011.
- [108] FELIX, F. S.; BRETT, C. M. A.; ANGNES, L. Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43 p. 1622–1627, 2007.
- [109] ISSAC, S. e KUMAR, K.G.; Voltammetric determination of sulfamethoxazole at amultiwalled carbon nanotube modified glassy carbon sensor and its application studies; **Drug Testing and Analysis**; v. 1, n. 7; p. 350-354; 2009.
- [110] SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization; **Journal of Chromatography A**, v. 987, n.1-2, p. 57–66, 2003.
- [111] LIU, J.; ZHOU, D.; LIU, X.; WU, K.; WAN, C. Determination of kojic acid based on the interface enhancement effects of carbon nanotube/alizarin red S modified electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 70, 20-24, 2009.
- [112] YANG, X. e ZHANG, H. Sensitive determination of kojic acid in foodstuffs using PVP (polyvinylpyrrolidone) modified acetylene black paste electrode. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1223-1227, 2007.
- [113] PACHECO, L. C. M. **Desenvolvimento de Metodologia Eletroanalítica para a Determinação de Resíduos de Pesticidas em Amostras de Alimentos e de Águas Naturais**. 2010, 151f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 2010.
- [114] WANG, S.; SU, W.; CHENG, S. A simultaneous and Sensitive Determination of Hydroquinone and Catechol at Anodically Pretreated Screen-Printed Carbon Electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, p. 1649-1664, 2010.
- [115] HAN, H. S.; YOU, J.; SEOL, H.; JEONG, H.; JEON, S. Electrochemical sensor for hydroquinone and catechol based on electrochemically reduced GO–terthiophene–CNT. **Sensors and Actuators B**, v. 194, p. 460– 469, 2014.
- [116] MA, X. e CHAO, M. Study on the Electrochemical Properties of Kojic Acid at a Poly(glutamic Acid)-Modified Glassy Carbon Electrode and Its Analytical Application. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 7, p.1458-1464, 2014.
- [117] MA, L. E ZHAO, G. Simultaneous Determination of Hydroquinone, Catechol and Resorcinol at Graphene Doped Carbon Ionic Liquid Electrode. **International Journal of Electrochemistry**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- [118] WANG, L.; HUANG, P.; WANG, H.; BAI, J.; ZHANG, L.; ZHAO, Y. Electrocatalytic Response of Hydroquinone and Catechol at Polyglycine Modified Glassy Carbon Electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 216 – 225, 2007.
- [119] FRASSON, A.P.Z.; CANSSI, C.M. Análise da qualidade de cremes com hidroquinona 2% manipulados

-
- no município de Ijuí/RS. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 197-201, 2008.
- [120] THOMPSON, J.E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**, 1ª edição. Porto Alegre: Artemed, 2006.
- [121] RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- [122] CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. **Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists**, 2ª edição, USA: Wiley, 1986.
- [123] BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, v.30 n.4, p. 51-58, 2005.
- [124] GIMENES, D. T.; SANTOS, W. T. P.; TORMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 74 – 78, 2010.
- [125] QUINTINO, M. S. M.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; ANGNES, L. Amperometric quantification of sodium metabisulfite in pharmaceutical formulations utilizing tetraruthenated porphyrin film modified electrodes and batch injection analysis. **Talanta**, v. 68, p. 1281–1286, 2006.