

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

GISELLE NATHALY CALAÇA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA
MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DA ASSOCIAÇÃO
ÁCIDO KÓJICO E HIDROQUINONA EM DERMOCOSMÉTICOS**

PONTA GROSSA
2010

GISELLE NATHALY CALAÇA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA
MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DA ASSOCIAÇÃO
ÁCIDO KÓJICO E HIDROQUINONA EM DERMOCOSMÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

PONTA GROSSA

2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

C141d Calaça, Giselle Nathaly
Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica
multivariada para o controle de qualidade da associação ácido kójico e
hidroquinona em dermocosméticos. / Giselle Nathaly Calaça. Ponta
Grossa, 2010.
106f
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade
Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora Profa Dra Noemi Nagata

1. Ácido Kójico. 2. Hidroquinona. 3. Espectrofotometria UV-Vis.
4. Calibração Multivariada. 5. PLSR. 6. Validação. I. Nagata,
Noemi . II. T

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

GISELLE NATHALY CALAÇA

**"DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA
MULTIVARIADA PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DA ASSOCIAÇÃO
ÁCIDO KÓJICO E HIDROQUINONA EM DERMOCOSMÉTICOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Noemi Nagata
Departamento de Química/UFPR



Prof. Dr. Patrício Guillermo Peralta Zamora
Departamento de Química/UFPR



Prof^a. Dr^a. Christiana Andrade Pessoa
Departamento de Química/UEPG/PR

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2010.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por permitir esta conquista, me fortalecer em todos os momentos e me guiar nessa caminhada.

Ao meu amado esposo César, pela compreensão, carinho e apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Vilma e Élio, minha irmã Michelle e meu sobrinho Lucas, por todo amor, dedicação, apoio e incentivo.

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Noemi Nagata, não somente pela dedicação, sabedoria e conhecimento com que conduziu este trabalho, mas também pela compreensão, carinho, apoio e permanente disponibilidade para me receber. Meu verdadeiro, muito obrigada!

À Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora, pela hospitalidade com que me recebeu e por ter contribuído muito para o aprimoramento deste trabalho com valiosas observações, além de ter aceitado o convite para participar da minha banca de defesa de dissertação.

À Professora Dra. Christiana Andrade Pessoa, por ter aceitado o convite para fazer parte da minha banca de defesa de dissertação e ter contribuído para finalização dessa dissertação com colocações pertinentes.

À minha amiga e companheira de trabalho Sandritcha, pela ajuda, amizade, paciência e, sobretudo, pelos momentos de descontração que tornaram os meus dias bem mais alegres.

Aos professores da pós-graduação em química, especialmente a Profa. Dra. Karen Wohnrath que, com carinho e paciência, sempre atendeu as minhas mais diversas solicitações.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 PELE E AGENTES DESPIGMENTANTES	3
2.1.1 Ácido Azeláico	4
2.1.2 Ácido Retinóico (Tretinoína)	5
2.1.3 Ácido Ascórbico (Vitamina C)	5
2.1.4 Ácido Fítico	6
2.1.5 Corticosteróide	6
2.1.6 α -hidroxiácidos	6
2.1.7 Hidroquinona	7
2.1.8 Ácido Kójico	8
2.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO	9
2.3 QUIMIOMETRIA	12
2.3.1 Planejamento Fatorial de Experimentos	12
2.3.2 Calibração Multivariada	13
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	16
2.4.1 Especificidade e Seletividade	18
2.4.2 Linearidade	18
2.4.3 Intervalo	18

2.4.4 Precisão	19
2.4.5 Exatidão	20
2.4.6 Robustez	21
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVOS GERAIS	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 REAGENTES	23
4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES	23
4.2.1 Solução trabalho de Ácido Kójico	23
4.2.2 Solução trabalho de Hidroquinona	23
4.2.3 Soluções trabalho de Cloreto Férrico	23
4.2.4 Soluções trabalho de 1,10-fenantrolina	24
4.2.5 Tampão Clark Lubs	24
4.3. ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	25
4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL	25
4.4.1 Deslocamento do Planejamento Fatorial	26
4.5 ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO AK-FE(III)	26
4.6 MÉTODO DA VARIAÇÃO CONTÍNUA (JOB)	27
4.7 ANÁLISE DO ÁCIDO KÓJICO	28
4.8 ANÁLISE DA HIDROQUINONA	28
4.9 ANÁLISE MULTIVARIADA	29
4.10 VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO	30
4.10.1 Especificidade	30
4.10.2 Linearidade e Intervalo	31
4.10.3 Precisão	31

4.10.4 Exatidão	32
4.10.5 Robustez	33
4.11 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ÁCIDO KÓJICO	35
5.1.1 Resultados da Otimização via Planejamento Fatorial	35
5.1.2 Deslocamento do Planejamento Fatorial	37
5.1.3 Resultados Obtidos Através do Estudo Cinético	38
5.1.4 Estequiometria do Complexo AK-Fe(III)	39
5.1.5 Curva Analítica do Ácido Kójico	42
5.2 HIDROQUINONA	43
5.2.1 Curva Analítica da Hidroquinona	44
5.3 ÁCIDO KÓJICO E HIDROQUINONA	46
5.3.1 Curva Analítica Convencional	47
5.3.2 Princípio da Aditividade Espectrofotométrica (Método de Vierordt)	49
5.3.3 Primeira Derivada dos Dados Espectrais	52
5.3.4 Calibração Multivariada	57
5.3.5 Modelo Multivariado para Determinação de Ácido Kójico	58
5.3.6 Modelo Multivariado para Determinação de Hidroquinona	63
5.4 RESULTADOS DOS ESTUDOS DE VALIDAÇÃO	69
5.4.1 Especificidade	69
5.4.2 Linearidade e Intervalo	70
5.4.3 Precisão	71
5.4.4 Exatidão	74
5.4.5 Robustez	74
5.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS	76

6 CONCLUSÕES	78
7 TRABALHOS FUTUROS	80
8 GLOSSÁRIO	81
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Estrutura da pele incluindo a localização dos melanócitos e melanina	3
Figura 02.	Estrutura química do ácido azeláico	4
Figura 03.	Estrutura química do ácido retinóico	5
Figura 04.	Estrutura química do ácido ascórbico	5
Figura 05.	Estrutura química do ácido fítico	6
Figura 06.	Estrutura química do ácido glicólico	7
Figura 07.	Estrutura química do ácido láctico	7
Figura 08.	Estrutura química da hidroquinona	7
Figura 09.	Estrutura química do ácido kójico	8
Figura 10.	Modelo geral do processo de calibração multivariada	15
Figura 11.	Planejamento experimental para obtenção das misturas dos conjuntos de calibração e validação	29
Figura 12.	Interpretação geométrica do efeito de interação $[\text{FeCl}_3]$ x pH	36
Figura 13.	Espectros de absorção na região do visível do complexo ácido kójico ($4,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e íon férrico ($8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) nos intervalos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27 minutos	39
Figura 14.	Espectros de absorção na região do visível dos complexos formados entre o ácido kójico e o íon ferro (III) pelo método da variação contínua	40
Figura 15.	Gráfico da fração molar <i>versus</i> a absorbância em 494 nm do complexo formado entre o ácido kójico e o ferro (III)	41

Figura 16:	Espectros de absorção na região do visível do complexo ácido kójico e íon férrico ($8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 3,0	42
Figura 17:	Curva analítica para determinação de ácido kójico em 494 nm (absorbância x concentração de AK)	43
Figura 18:	Reação de complexação ferro (II) e 1,10-fenantrolina	44
Figura 19:	Espectros de absorção na região do visível do complexo HQ, Fe^{+2} ($1,95\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina ($4,8\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$)	44
Figura 20:	Curva analítica para determinação de hidroquinona em 510 nm (absorbância x concentração de HQ)	45
Figura 21:	Espectros de absorção do complexo Fe^{+2} e 1,10-fenantrolina para determinação indireta de HQ ($3,0\text{E-}05 \text{ mol L}^{-1}$) e do complexo AK ($5,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e Fe^{+2}	46
Figura 22:	Curva analítica (absorbância x concentração) para determinação de AK em 510 nm (a) e HQ em 494 nm (b)	50
Figura 23:	Primeira derivada dos espectros na região do visível de ácido kójico	52
Figura 24:	Curva analítica derivada para determinação de hidroquinona ($da/d\lambda$ x concentração HQ)	53
Figura 25:	Primeira derivada dos espectros na região do visível de hidroquinona	55
Figura 26:	Curva analítica derivada para determinação de ácido kójico ($da/d\lambda$ x concentração de AK)	55
Figura 27:	Espectros de absorção na região visível das misturas de ácido kójico e hidroquinona do conjunto de calibração, utilizados no desenvolvimento dos modelos multivariados	58
Figura 28:	Representação da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV) de ácido kójico em função do processamento e do número de variáveis latentes	59

Figura 29:	Gráfico do coeficiente de regressão vs. comprimento de onda do modelo para AK	60
Figura 30:	Gráfico de <i>loadings</i> das três primeiras variáveis latentes vs. comprimento de onda do modelo para AK	61
Figura 31:	Gráfico de Resíduos Student vs. <i>Leverage</i> do modelo para AK	62
Figura 32:	Valor Previsto (CV) vs. Valor Real do modelo para AK	62
Figura 33:	Representação da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV) de hidroquinona em função do processamento e do número de variáveis latentes	64
Figura 34:	Gráfico do coeficiente de regressão vs. comprimento de onda do modelo para HQ	65
Figura 35:	Gráfico de <i>loadings</i> das duas primeiras variáveis latentes vs. comprimento de onda do modelo para HQ	66
Figura 36:	Gráfico de Resíduos Student vs. <i>Leverage</i> do modelo para HQ	67
Figura 37:	Valor Previsto (CV) vs. Valor Real do modelo para HQ	67
Figura 38:	Gráfico do Resíduo x Valor Real (mol/L) para o ácido kójico (A) e para hidroquinona (B)	71
Figura 39:	Espectros de absorção na região visível da mistura AK ($1,5 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹) e HQ ($4,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) nas temperaturas de 5 a 55 °C na avaliação da robustez	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Ensaio necessários para a validação do método analítico segundo sua finalidade.	17
Tabela 02.	Concentrações das soluções trabalho utilizadas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com respectivas massas, volumes e etapas experimentais.	24
Tabela 03.	Variáveis e níveis estudados na reação de complexação entre ácido kójico e íon férrico.	25
Tabela 04.	Ensaio experimentais para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados do planejamento fatorial 2^2 .	26
Tabela 05.	Variáveis e Níveis estudados no deslocamento do planejamento fatorial 2^2 .	26
Tabela 06.	Ensaio do método da variação contínua para determinação da estequiometria do complexo entre o ácido kójico e o íon férrico.	27
Tabela 07.	Ensaio do método de recuperação para determinação da especificidade.	31
Tabela 08.	Concentrações de ácido kójico e hidroquinona utilizadas nos ensaios de precisão.	32
Tabela 09.	Ensaio para análise das amostras reais de dermocosméticos (base gel), obtidos em farmácias de manipulação da região de Ponta Grossa e Curitiba/PR.	34
Tabela 10.	Resultados da otimização via planejamento fatorial 2^2 da reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico.	35
Tabela 11.	Efeitos calculados para otimização via planejamento fatorial 2^2 da reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico.	36

Tabela 12.	Resultados do deslocamento do planejamento fatorial 2^2 .	37
Tabela 13.	Efeitos calculados para o planejamento 2^2 deslocado.	38
Tabela 14.	Resultados obtidos via curva analítica para determinação de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação externa.	47
Tabela 15.	Resultados obtidos via curva analítica para determinação de hidroquinona nas misturas do conjunto de validação externa.	48
Tabela 16.	Resultados obtidos via princípio da aditividade espectrofotométrica para determinação de AK e HQ nas misturas do conjunto de validação externa.	51
Tabela 17.	Resultados obtidos via primeira derivada para determinação de HQ (498 nm) nas misturas do conjunto de validação externa	54
Tabela 18.	Resultados obtidos via primeira derivada para determinação de AK (510 nm) nas misturas do conjunto de validação externa	56
Tabela 19.	Resultados obtidos para o modelo PLSR para determinação de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação externa	63
Tabela 20.	Resultados obtidos para o modelo PLSR para determinação de hidroquinona nas misturas do conjunto de validação externa	68
Tabela 21.	Comparação das metodologias convencionais e multivariadas para determinação de AK e HQ nas misturas do conjunto de validação externa utilizando-se RMSEP (mol L^{-1}) e erro relativo médio	69
Tabela 22.	Resultados do ensaio de recuperação para determinação da especificidade	70
Tabela 23.	Resultados do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrida)	72

Tabela 24.	Resultados do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corrida)	73
Tabela 25.	Resultados obtidos na determinação da mistura AK ($1,5 \text{ E-04 mol L}^{-1}$) e HQ ($4,0 \text{ E-05 mol L}^{-1}$) via PLSR em diferentes temperaturas na avaliação da robustez	75
Tabela 26.	Resultados de previsão de ácido kójico e hidroquinona em amostras reais, utilizando-se o método multivariado desenvolvido	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AHAs	α -hidroxiácidos
AK	Ácido Kójico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coeficiente de Variação
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo (sinônimo de CV)
DCM	Dados Centrados na Média
HQ	Hidroquinona
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
PCA	Análise de Componentes Principais (<i>Principal Components Analysis</i>)
PLSR	Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Square Regression</i>)
RMSEC	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração
RMSECV	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada
RMSEP	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão
UV	Ultra-Violeta
VIS	Visível
VL	Variável Latente
VLs	Variáveis Latentes

RESUMO

O Ácido Kójico (AK) e a Hidroquinona (HQ) são agentes despigmentantes freqüentemente comercializados em associações dermocosméticas de manipulação magistral, utilizadas no tratamento de discromias. A necessidade de metodologias analíticas de baixo custo que viabilizem o controle de qualidade dessa associação é evidente. Em função de características como alta sensibilidade, baixo custo e simplicidade operacional, o presente trabalho tem por objetivo a utilização da espectrofotometria na região do visível associada a métodos de calibração multivariada, principalmente Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) para determinação de AK e HQ. A metodologia proposta consiste na complexação de ácido kójico com o íon Fe^{3+} ($\lambda = 494 \text{ nm}$), enquanto a hidroquinona reduz os íons Fe^{3+} a Fe^{2+} , que por sua vez complexam com 1,10-fenantrolina ($\lambda = 510 \text{ nm}$). A determinação quantitativa de AK e HQ pelos métodos convencionais de análise foi realizada via curva analítica, princípio da aditividade espectrofotométrica e primeira derivada, cujos erros relativos médios foram: 20,65% (HQ) e 469,91% (AK), 41,44% (HQ) e 47,11% (AK), 57,59% (HQ) e 156,72% (AK), respectivamente. Os resultados dos métodos convencionais foram comparados ao PLSR, sendo que os modelos de melhor capacidade preditiva empregaram: faixa espectral de 350 a 800 nm, dados centrados na média, 03 e 02 variáveis latentes para ácido kójico e hidroquinona, respectivamente. Os erros relativos médios obtidos a partir desses modelos foram: 4,20% para AK e 6,05% para HQ, evidenciando que o método PLSR apresentou melhores resultados para a quantificação dos analitos, quando comparado aos métodos convencionais. A metodologia multivariada desenvolvida foi validada segundo critérios da ANVISA e posteriormente utilizada para previsão dos analitos em amostras reais obtidas em farmácias de manipulação da região.

Palavras-Chave: Ácido Kójico, Hidroquinona, Espectrofotometria UV-Vis, Calibração Multivariada, PLSR, Validação.

ABSTRACT

Kojic Acid (KA) and Hydroquinone (HQ) are depigmenting agents used as skin-whitening cosmetics to treat dyschromias. The need for low cost analytical methodologies that enable quality control of this association is evident. Due to the characteristics such as high sensitivity, low cost and operational simplicity, this work aims to use spectrophotometry in the visible region and multivariate calibration tools, mainly Partial Least Squares Regression (PLSR) for quantitative determination of KA and HQ. The method is based on the complexation of kojic acid with Fe^{3+} ion ($\lambda = 494\text{nm}$), while hydroquinone reduces Fe^{3+} ions to Fe^{2+} , which complex with 1,10-phenanthroline ($\lambda = 510\text{nm}$). The quantitative determination of KA and HQ by conventional methods was performed by analytical curve, spectrophotometric additivity principle and first-derivative spectrophotometry, and the average errors were: 20,65% (HQ) and 469,91% (AK), 41,44% (HQ) and 47,11% (AK), 57,59% (HQ) and 156,72% (AK), respectively. The results of conventional methods were compared to PLSR, and the multivariate models with better predictive capacity used: spectral range from 350 to 800 nm, mean center data, 03 and 02 latent variables for kojic acid and hydroquinone, respectively. The mean relative errors obtained from these models were: 4,20% for AK and 6,05% for HQ, indicating that PLSR method showed better results for the quantification of analytes, when compared to conventional methods. The multivariate methodology developed was validated according to ANVISA criteria and then used for quantification of analytes in real samples, obtained from manipulation pharmacies of the region.

Keywords: Kojic Acid, Hydroquinone, UV-Vis spectrophotometry, Multivariate Calibration, PLSR, Validation.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o número de produtos para clarear a pele teve um grande crescimento (AZULAY-ABULAFIA *et al.*, 2003). Dentre os vários agentes despigmentantes disponíveis no mercado em associações dermocosméticas, destacam-se o ácido kójico e a hidroquinona. O ácido kójico, 5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona é uma substância natural produzida por vários fungos e bactérias (LIN; YANG; WU, 2007) que possui ação clareadora em função da sua propriedade quelante de íons cobre, responsável pela inativação da enzima tirosinase e conseqüente inibição na formação de melanina (PICARDO e CARRERA, 2007). A hidroquinona, 1,4-Dihidroxibenzeno, por sua vez, produz despigmentação não definitiva, inibindo a oxidação enzimática da tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina e de outros processos metabólicos dos melanócitos (AZULAY-ABULAFIA *et al.*, 2003).

Altas concentrações de hidroquinona em produtos de uso tópico podem causar severos efeitos colaterais, e como o ácido kójico tem ação equivalente (DRAELOS, 2008), porém menos abrasiva que a hidroquinona, diversas formulações contendo a associação destes princípios ativos são utilizadas no Brasil em tratamentos dermatológicos, tendo sua origem predominante na manipulação magistral em farmácias de manipulação. Como estes estabelecimentos produzem quantidades pequenas das formulações, o controle de qualidade do produto final é geralmente inexistente, já que o mesmo se fundamenta em modernas técnicas instrumentais com elevado custo e que dificultam a implementação de rotinas analíticas em laboratórios de pequeno ou médio porte, e em órgãos de fiscalização ligados ao governo. Sendo assim, a necessidade de metodologias analíticas que viabilizem o controle de qualidade deste tipo de produto farmacêutico é evidente. Em função de características como alta sensibilidade, baixo custo e simplicidade operacional, a espectrofotometria UV-Vis corresponde a uma ferramenta analítica de primeira importância (BOSCH *et al.*, 2008). No entanto, a baixa seletividade da técnica faz com que a ocorrência de sobreposição espectral seja bastante freqüente, o que muitas vezes inviabiliza o desenvolvimento de metodologias analíticas orientadas à determinação de misturas.

Nos últimos anos, diversas ferramentas de calibração multivariada têm sido propostas para contornar os problemas associados à interferência espectral entre espécies de interesse, viabilizando a sua determinação simultânea, mesmo em condições de severa sobreposição de bandas (CORDEIRO *et al.*, 2008).

Métodos espectrofotométricos na região do ultravioleta poderiam ser utilizados na determinação de ácido kójico e hidroquinona em dermocosméticos, já que os mesmos possuem sinais de absorção nessa região. No entanto, como uma grande variedade de compostos orgânicos também absorvem nessa região, os constituintes da base (creme ou gel) utilizados nas formulações, dificultariam esta determinação. Para eliminar a interferência do veículo, a qual se manifesta intensamente na região ultravioleta do espectro, é possível recorrer ao uso de derivatização química, objetivando a formação de espécies coloridas, e em alguns casos obtendo-se um aumento da sensibilidade analítica. Assim, o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de uma metodologia analítica orientada à determinação da associação dermocosmética de ácido kójico (complexando com íons ferro (III)) e hidroquinona (responsável pela redução do Fe (III) a Fe (II) que posteriormente complexa com 1,10-fenantrolina), através da utilização da espectrofotometria na região do visível e ferramentas de calibração multivariada, principalmente Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE E AGENTES DESPIGMENTANTES

A pele recobre a superfície do corpo e desempenha múltiplas funções. Sua cor é resultado da presença e interação de uma série de substâncias encontradas na epiderme e derme, denominadas cromóforos, sendo a melanina o complexo mais importante e também a maior fonte de coloração (MONTAZ *et al.*, 2008). A melanina é um pigmento de cor marrom-escuro, sintetizado com a participação da enzima tirosinase, em células altamente especializadas, chamadas melanócitos, as quais estão localizadas na camada basal da epiderme (Figura 01). Devido à ação da enzima tirosinase, o aminoácido tirosina é transformado primeiro em 3,4 diidroxifenilalanina (DOPA), e posteriormente a dopa-quinona, que após várias transformações, converte-se em melanina (YOON *et al.*, 2003; JUNQUEIRA *et al.*, 2004).

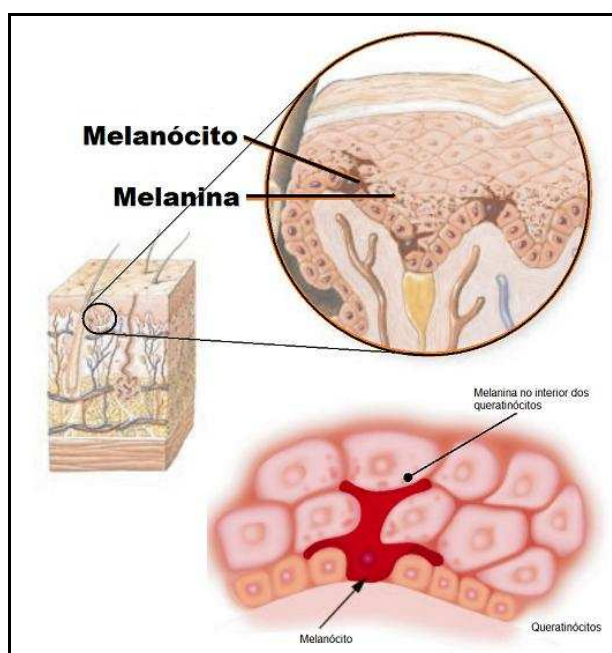


Figura 01: Estrutura da pele incluindo a localização dos melanócitos e melanina

FONTE: JUNIOR, 2008.

O aumento anômalo na formação de melanina pode estar relacionado a uma variedade de causas, os fatores contribuintes mais comuns são: pré-disposição genética, gravidez, uso de contraceptivos orais, disfunção endócrina ou tratamento hormonal e principalmente exposição à radiação UV da luz solar (GUPTA *et al.*, 2006). Para reduzir os efeitos desta anomalia, vários agentes despigmentantes estão disponíveis para comercialização em formulações contendo um ou mais princípios ativos em associação, sendo que nos últimos anos o desenvolvimento de produtos para clarear a pele teve um crescimento explosivo (AZULAY-ABULAFIA *et al.*, 2003). Sabe-se que o tratamento de discromias (alterações na coloração da pele) é difícil, pois muitos compostos efetivos no tratamento apresentam propriedades irritantes e podem, em certos casos, promover descamação.

Entre os agentes despigmentantes mais usados estão: ácido azeláico, ácido retinóico (tretinoína), ácido ascórbico, ácido fítico, corticosteróide, α -hidroxiácidos, hidroquinona e o ácido kójico.

2.1.1 Ácido Azeláico

O ácido azeláico (Figura 02) é um ácido dicarboxílico saturado, de ocorrência natural, obtido de culturas de *Pityrosporum ovale*. É um agente terapêutico efetivo no tratamento de discromias, devido sua propriedade inibidora na produção de melanina, quando aplicado na forma de creme ou gel, em concentrações de 15% a 20% (GAO *et al.*, 2008).

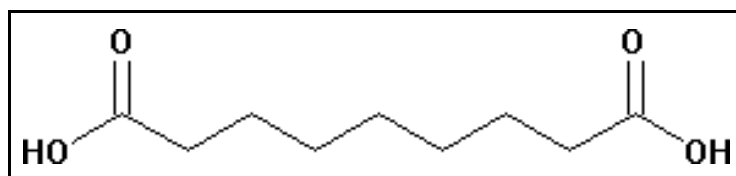


Figura 02: Estrutura química do ácido azeláico

FONTE: MERCK, 2009.

2.1.2 Ácido Retinóico (Tretinoína)

A ação despigmentante do ácido retinóico ou tretinoína (Figura 03) baseia-se na habilidade de acentuar a proliferação queratinócita, acelerando a taxa de renovação da epiderme (ORTONNE e PASSERON, 2005). Concentrações entre 0,05% - 0,1% são bastante utilizadas, sendo que os efeitos colaterais mais comuns associado ao uso são: dermatite retinóica caracterizada por queimadura, eritema, descamação e pele seca (GUPTA *et al.*, 2006; RENDON *et al.*, 2006).

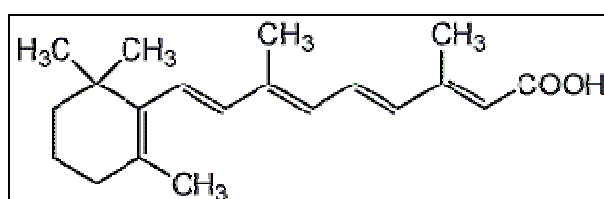


Figura 03: Estrutura química do ácido retinóico

FONTE: MERCK, 2009.

2.1.3 Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico (Figura 04) é um agente anti-oxidante que afeta a melanogênese (processo de formação da melanina) por reduzir a dopa-quinona em DOPA. Trata-se de uma substância muito instável e rapidamente oxidada em solução aquosa. Para contornar essa desvantagem, dá-se preferência ao uso de seu derivado, fosfato de ascorbil magnésio que apresenta maior estabilidade química (PICARDO e CARRERA; 2007).

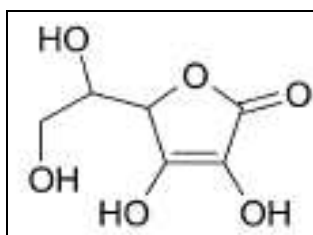


Figura 04: Estrutura química do ácido ascórbico

FONTE: LITOS *et al.*, 2007.

2.1.4 Ácido Fítico

O ácido fóico (Figura 05) é um despigmentante de origem natural com propriedades hidratantes encontrados nas sementes de alguns cereais como: aveia, arroz e gérmen de trigo (ROSSETO, 2007). Atua como quelante de íons cobre, inibindo a formação de melanina. Costuma ser utilizado em concentrações de 1-2% e sua principal vantagem é o baixo potencial irritativo, o que permite seu uso em regiões sensíveis da pele, como as pálpebras (ORDIZ, 2003).

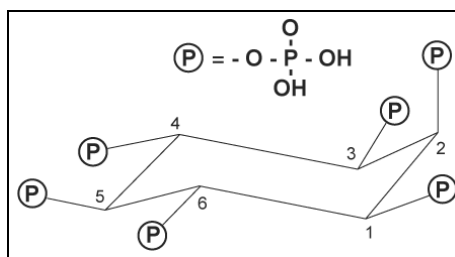


Figura 05: Estrutura química do ácido fóico

FONTE: FARIA *et al.*, 2006.

2.1.5 Corticosteróide

Vários tipos de corticosteróides, como hidrocortisona, dexametasona, betametasona entre outros, têm sido utilizados, por via tópica, no tratamento de discromias. Algumas vezes associado a outros agentes despigmentantes como hidroquinona e tretinoína para obtenção de melhores resultados. Tratamentos em longo prazo não são recomendados devido ao surgimento de numerosos efeitos adversos próprios dos corticosteróides (PRIGNANO *et al.*, 2007).

2.1.6 α -hidroxiácidos

Dentre os vários α -hidroxiácidos (AHAs), o ácido glicólico (Figura 06) e o ácido láctico (Figura 07) são os mais populares e efetivos no tratamento de

discromias. Recentes estudos demonstram a capacidade desses AHAs em aumentar a renovação celular e inibir diretamente a atividade da tirosinase (PICARDO e CARRERA, 2007).

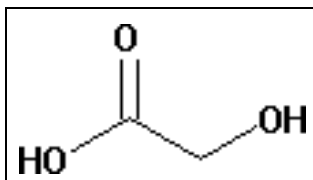


Figura 06: Estrutura química do ácido glicólico

FONTE: MERCK, 2009.

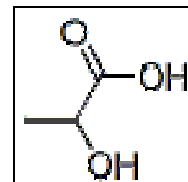


Figura 07: Estrutura química do ácido láctico

FONTE: CHEMICAL BOOK, 2008.

2.1.7 Hidroquinona

A hidroquinona (Figura 08), 1,4-dihidroxibenzeno, continua sendo o agente branqueador mais prescrito em todo o mundo, sendo introduzido para uso clínico em 1961 (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Os primeiros relatos a respeito de sua eficácia na redução da pigmentação da pele datam antes de 1936. A hidroquinona é um hidroxifenol de estrutura química similar ao precursor da melanina e atua principalmente pela inibição da tirosinase, reduzindo a hidroxilação da tirosina em diidroxifenilalanina. Outros supostos mecanismos de ação são: inibição das sínteses do DNA e RNA, degradação dos melanossomos e destruição dos melanócitos. As concentrações empregadas usualmente variam de 2% a 5% (PICARDO e CARRERA, 2007). Recomenda-se a utilização de hidroquinona apenas sob prescrição médica, pois em concentrações acima de 5% pode causar severos efeitos colaterais incluindo dermatites, eritema, leucoderma, queimadura e hiperpigmentação (LIN; YANG; WU, 2007).

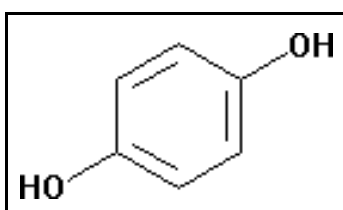


Figura 08: Estrutura química da hidroquinona

FONTE: MERCK, 2009.

2.1.8 Ácido Kójico

O ácido kójico (Figura 09), também conhecido por 5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona é uma substância natural produzida por vários fungos e bactérias, entre elas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter* (LIN; YANG; WU, 2007).

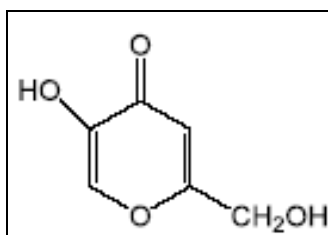


Figura 09: Estrutura química do ácido kójico

FONTE: CORRER, 2004.

Entre suas várias propriedades destacam-se a ação antimicrobiana e quelante de íons cobre, sendo esta última, responsável pela inativação da tirosinase e conseqüente ação inibidora na formação de melanina, (CANO *et al.*, 1994; PICARDO e CARRERA, 2007). Este mecanismo confere ao ácido kójico a ação clareadora, permitindo seu uso em preparações cosmecêuticas utilizadas no tratamento tópico das discromias.

Segundo o estudo do perfil das prescrições de ácido kójico realizado por CORRER (2004), a associação dermocosmética de ácido kójico e hidroquinona ocupa a terceira posição nas formulações freqüentemente prescritas contendo dois agentes clareadores. Nesta pesquisa foram analisadas 163 receitas que continham ácido kójico de forma isolada ou em associação com outros agentes despigmentantes, preparadas no período de maio a agosto de 2003 em quatro farmácias de manipulação da região de Curitiba.

Sabe-se que diversas formulações contendo ácido kójico e hidroquinona são utilizadas no Brasil em tratamentos dermatológicos, geralmente comercializado em preparações dermocosméticas, através da manipulação magistral em farmácias de manipulação. Como estes estabelecimentos produzem quantidades pequenas das formulações, geralmente o controle de qualidade do produto final é inexistente.

Dentro deste contexto, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas, de baixo custo, que viabilizem o controle de qualidade

desta associação dermocosmética utilizada em tratamentos dermatológicos para clarear a pele.

2.2 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

Muitos autores têm quantificado separadamente ácido kójico e hidroquinona em cosméticos (gel, creme e emulsão), assim como em outros tipos de matrizes por diversas técnicas.

OLIVEIRA e colaboradores (2007) desenvolveram um sensor biomimético utilizando um novo complexo dinuclear de cobre (II) $[\text{Cu}_2(\text{HL})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2$ para determinar a concentração de hidroquinona em cosméticos por voltametria de onda quadrada. Obtiveram-se resultados satisfatórios nas amostras comerciais testadas, sendo que os erros relativos mostraram-se inferiores a 0,53%.

Por sua vez, GARCIA e colaboradores (2005) desenvolveram e validaram dois métodos para determinação de hidroquinona em formulações, um via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por fase reversa e outro via espectrofotometria UV derivativa (UVDS). Ambas as metodologias mostraram resultados satisfatórios, com ampla faixa linear (6-30 $\mu\text{g/ml}$ para HPLC e 10-26 $\mu\text{g/ml}$ para UVDS), baixo limite de quantificação (0,26 $\mu\text{g/ml}$ para HPLC e 0,46 $\mu\text{g/ml}$ para UVDS) e com Desvio Padrão Relativo (RDS) inferiores a 1,34% para HPLC e 0,98% para UVDS na determinação do analito em gel e creme na faixa de concentração de 2 a 4%. As metodologias desenvolvidas foram comparadas por análise estatística (teste *t* e Teste F) e não mostraram diferença analítica significativa com 95% de confiança, indicando que as propostas podem ser utilizadas nas análises de rotina para o controle de qualidade de produtos que contenham a hidroquinona como único princípio ativo.

AHAMMAD e colaboradores (2010) desenvolveram um método eletroquímico simples e seletivo, baseado na anodização de um eletrodo de carbono vítreo (ECV), para a determinação simultânea de hidroquinona (HQ) e catecol (CT) utilizando voltametria de pulso diferencial. O ECV ativado apresentou estabilidade, reprodutibilidade (RSD de 0,61%-HQ e 0,73%-CT, $n=10$) e boa relação linear ($R = 0,98$) entre os picos de corrente anódica e concentração, no intervalo de $0,5 \times 10^{-6}$ a

$200 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, com o limite de detecção de 0,16 e 0,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para hidroquinona e catecol, respectivamente. Resultados satisfatórios foram obtidos na determinação dos analitos em amostras de água contaminada, com taxas de recuperação de 96,6-101,7% para a hidroquinona e 98,8-103,9% para catecol, demonstrando claramente a aplicabilidade e a confiabilidade do método proposto.

Com o objetivo de diminuir os efeitos de matriz de amostras reais, LIN, SHEU, WU e HUANG (2005) propuseram a quantificação de hidroquinona em emulsão cosmética usando a técnica de microdiálise para preparação de amostras, acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para determinar a exatidão e precisão do método, foram realizados ensaios em triplicata em quatro diferentes dias. Os erros relativos foram menores que 13,0% e o RDS menor que 7,55%, sendo que a taxa de recuperação variou de 89 a 112%. O método foi aplicado a 4 amostras reais, e os resultados se mostraram concordantes com os valores declarados pelos fabricantes. Uma das vantagens ressaltadas pelos autores está relacionada com o menor pré-tratamento da amostra e baixo consumo de solventes orgânicos.

LIN, WU e HUANG (2007) também utilizaram a técnica de microdiálise on-line para determinar simultaneamente ácido kójico, ascorbil glucosídeo e niacinamida (vitamina B₃) em cosméticos clareadores via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Nas misturas sintéticas dos três agentes clareadores, os autores obtiveram taxas de recuperação entre 92-106% com boa repetibilidade (RSD= 3,9-8,7%) do método. Foram testadas seis amostras comerciais contendo os agentes clareadores em diferentes dosagens, obtendo-se valores concordantes com os declarados pelo fabricante e dentro dos limites estabelecidos pela legislação de Taiwan.

CORRER e colaboradores (2005) determinaram ácido kójico em creme por espectroscopia UV-Vis e métodos de calibração multivariada. Os resultados do ensaio de recuperação mostraram valores de 98,29%, 98,55% e 98,43% para as três amostras analisadas e coeficientes de variação inferiores a 2%, dentro dos limites aceitos pela ANVISA. A metodologia testada mostrou-se exata e precisa, indicando uma boa alternativa para quantificação do analito.

LIU e colaboradores (2009) utilizaram eletrodos de pasta de nanotubo de carbono de paredes múltiplas modificado com vermelho de alizarina S como sensor para a determinação ácido kójico em produtos alimentícios. O eletrodo desenvolvido mostrou-se bastante seletivo e apresentou excelente reprodutibilidade (RSD = 5,2%,

n=10). A corrente de oxidação do ácido kójico foi proporcional à sua concentração dentro do intervalo de $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,998 e um limite de detecção de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Na análise de amostras reais, a determinação de ácido kójico foi realizada pelo método de adição de padrão em amostras de molho e vinagre com taxas de recuperação entre 97,7% - 101,8% e RSD inferior a 5%. Os resultados obtidos pelo método proposto apresentaram boa concordância quando comparados aos resultados obtidos por HPLC.

Por outro lado, relatos de determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona são pouco comuns, como é o caso da proposta de análise de HUANG e colaboradores (2004) que determinaram simultaneamente ácido kójico, hidroquinona, fosfato de ascorbil magnésio, ascorbil glucosídeo e arbutin em cosméticos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os ensaios de recuperação mostraram valores entre 93,5% – 103,3%, com RSD menor que 1,3%. Nos ensaios intra-corrida e inter-corrida obtiveram-se RSD menores que 2,4%. A metodologia proposta mostrou-se satisfatória para determinação simultânea dos analitos.

Na proposta de LIN, YANG e WU (2007) foi empregado um planejamento fatorial para otimizar a metodologia de cromatografia capilar eletrocínica micelar (MEKC) na determinação simultânea de ácido kójico, hidroquinona e arbutin em cosméticos. Os erros relativos encontrados no método de validação foram inferiores a 3,0% e a taxa de recuperação superior a 99%. Na análise das amostras comerciais, a metodologia foi aplicada com sucesso no controle de qualidade dos clareadores citados, obtendo-se valores concordantes com os declarados pelo fabricante e com os limites estabelecidos pela legislação de Taiwan.

Por sua vez, CHISVERT e colaboradores (2010) empregaram a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para determinar ácido kójico, ácido azelaico, arbutin, hidroquinona e resorcinol em cosméticos. O método proposto mostrou-se satisfatório, com bons limites de detecção e quantificação. Nos ensaios intra-corrida e inter-corrida obtiveram-se variações inferiores a 10%. Para determinar a exatidão do método, quantificou-se os analitos em amostras cosméticas preparadas no laboratório com erros relativos menores que 5%. A metodologia desenvolvida foi aplicada com sucesso na determinação dos analitos em nove amostras comerciais, mostrando a presença de agentes despigmentantes não

declarados no rótulo em quatro das amostras analisadas.

2.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química relevante com a análise dos dados obtidos (FERREIRA *et al.*, 1999).

2.3.1 Planejamento Fatorial de Experimentos

O planejamento fatorial é uma metodologia que apresenta características vantajosas para estudar a influência de variáveis em processos, pois requer um pequeno número de ensaios, funciona bem na presença de erros aleatórios e principalmente avalia as interações entre as variáveis, permitindo verificar os efeitos sinérgicos ou antagônicos relacionados às respostas obtidas.

Para executar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores, sendo realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados (BRUNS *et al.*, 2003). De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^a , onde "a" é o número de fatores "b" é o número de níveis escolhidos. Em geral, os planejamentos fatoriais do tipo 2^a são os mais comuns, já que os mesmos requerem a realização de poucos experimentos. É evidente que com um número reduzido de níveis não é possível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis. Entretanto, é possível observar tendências importantes para a realização de investigações posteriores (EIRAS *et al.*, 1999).

LEITÃO e SILVA (2008) utilizaram planejamento fatorial fracionário e completo, para otimização das reações do anti-hipertensivo diltiazem com hidroxilamina e um sal de ferro (II). Primeiramente, o diltiazem reage com a hidroxilamina formando um ácido hidroxâmico que posteriormente reage com o sal

de ferro (II) formando um complexo de coloração vermelha, com absorção em 512 nm. As condições otimizadas da reação de complexação foram: solvente metanol, concentração de hidroxilamina de 9,4%, concentração de NaOH de 18,75%, concentração da solução de ferro (II) de 2,0%, volume mínimo de ácido perclórico 7% (v/v) (suficiente apenas para neutralizar o NaOH) e reação a temperatura ambiente. Uma metodologia cinética espectrofotométrica multivariada orientada a determinação deste anti-hipertensivo em diferentes formulações farmacêuticas foi desenvolvida utilizando a reação otimizada, na qual se obteve resultados similares ao método cromatográfico padrão, na determinação do analito em amostras reais. Na análise do padrão farmacêutico obteve-se limite detecção de 6 e 2 mg/L, e na análise de formulações farmacêuticas de 41 e 39 mg/L, utilizando-se PARAllel FACtor analysis (PARAFAC2) e Resolução de Curva Multivariada – Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS) respectivamente. Em ambas as metodologias, dados de absorbância em três dimensões (comprimento de onda, tempo e concentração) foram adquiridos para posterior processamento. (Leitão e Silva, 2007).

Por sua vez, GIROTTO e colaboradores (2007) aplicaram um planejamento fatorial completo 2^4 para avaliar os principais fatores e suas interações no processo de extração em fase sólida (SPE) dos hormônios 17- β - estradiol, estrona e 17 β etinilestradiol via HPLC com detector de fluorescência. As melhores condições obtidas foram: 500 mL da amostra, condicionamento da fase sólida (C18) com acetona (4 mL), metanol (6 mL) e água pH 3 (10 mL), e eluição dos analitos com 4 mL de acetona.

2.3.2 Calibração Multivariada

Nos últimos anos, diversas ferramentas de calibração multivariada têm sido propostas para contornar os problemas associados à interferência espectral, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade. Isto é, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental (NAGATA *et al.*, 2001). De maneira geral, metodologias multivariadas permitem explorar toda a informação fornecida pela

técnica instrumental, favorecendo o desenvolvimento de modelos de calibração confiáveis, mesmo em situações de extrema sobreposição espectral ou complexidade de sinal (CORDEIRO *et al.*, 2008).

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação matemática entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. No caso particular deste projeto, os espectros e as concentrações de ácido kójico e hidroquinona.

Esta metodologia consiste, basicamente, de duas fases: a calibração e a previsão. Na etapa de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de comprimentos de ondas diferentes, formando uma matriz **X**, com “n” linhas e “p” colunas. Também uma matriz **Y** com os valores de concentração pode ser formada contendo “n” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “q” colunas, indicando o número de diferentes analitos presentes nas amostras. O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando o vetor dos coeficientes de regressão – **b**) que melhor possa reproduzir **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (Equação 01). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (Equação 02). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator **Y** da Equação 01 para obtenção da Equação 02, implica na utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, **(Xteste)^t** (NAGATA *et al.*, 2001).

$$\mathbf{Xcal} = \mathbf{b} * \mathbf{Ycal} \text{ (Equação 01)}$$

$$\mathbf{Yteste} = (\mathbf{Xteste})^t * \mathbf{b} \text{ (Equação 02)}$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme ilustra a Figura 10. As respostas de absorção dos espectros, a cada valor de comprimento de onda, são as variáveis independentes, e as concentrações dos fármacos nas amostras, as variáveis dependentes.

Dentre os métodos existentes para determinação do vetor de regressão (**b**), podemos citar a Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), a qual se baseia na Análise de Componentes Principais (PCA) (FERREIRA *et al.*, 1999).

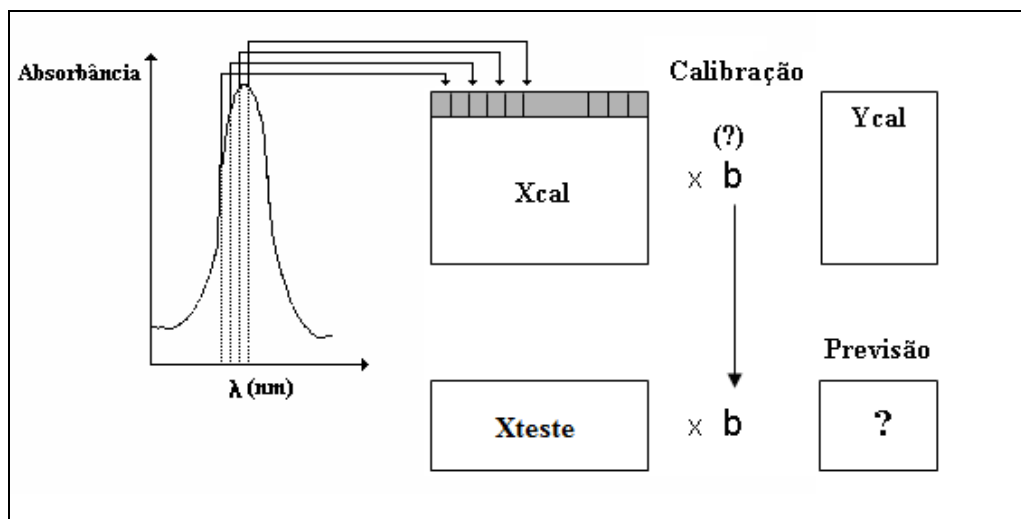


Figura 10: Modelo geral do processo de Calibração Multivariada

FONTE: NAGATA *et al.*, 2001

O método PCA decompõe a matriz de dados **X**, construindo-se um novo sistema de eixos (denominados componentes principais). Isto possibilita que as amostras possam ser representadas e visualizadas em um número menor de dimensões, sem perda de informação analítica relevante. Com a obtenção de um novo sistema de eixos, a parte não modelada de **X** é considerada como uma matriz de erros (**E**), as novas coordenadas da amostra são denominadas “scores” (**T** ou **U**), e o peso que cada variável antiga contribui para formar as componentes principais são chamados “loadings” (**P** ou **Q**).

No método PLSR, tanto a matriz das variáveis independentes **Xcal** (Equação 03), como a das variáveis dependentes **Ycal** (Equação 04), sofrem decomposição matricial, sendo representadas na forma de “scores” e “loadings”. Posteriormente, realiza-se uma relação entre as duas matrizes de “scores” (Equação 05) de cada um dos blocos (variáveis independentes e dependentes), utilizando um modelo linear.

$$\mathbf{Xcal} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \text{ (Equação 03)}$$

$$\mathbf{Ycal} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{E} \text{ (Equação 04)}$$

$$\mathbf{U} = \mathbf{b} * \mathbf{T} \text{ (Equação 05)}$$

Obtido o vetor de regressão, é possível utilizá-lo para realizar as previsões de concentrações de novas amostras através de seus respectivos dados espectrais e empregando-se a Equação 02 (NAGATA *et al.*, 2001).

Este método multivariado (PLSR) possui a vantagem de a calibração poder ser realizada eficientemente mesmo na presença de interferentes, não havendo a necessidade do conhecimento do número e natureza dos mesmos, além de ser um método robusto, isto é, seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (FERREIRA *et al.*, 1999).

CORDEIRO e colaboradores (2008) utilizaram espectroscopia UV-Vis acoplada a calibração multivariada para determinação simultânea de sulfametoxazol e trimetoprima em associações farmacêuticas. Durante a fase de validação os erros de previsão foram inferiores a 3% para ambos os fármacos em estudo. Na análise das amostras reais, o modelo permite uma excelente previsão do medicamento de referência (Bactrim), com erros inferiores a 7% em relação aos valores determinados pela técnica cromatográfica padrão.

FERRARO e colaboradores (2001) empregaram a calibração multivariada para contornar problemas de interferências espectrais e determinar simultaneamente furosemida e cloridrato de amilorida em amostras sintéticas e tabletes comerciais por espectrofotometria UV-Vis. Os resultados obtidos na análise das amostras reais foram satisfatórios para ambos os fármacos, e estão de acordo com os obtidos via HPLC.

Por sua vez, GONZÁLEZ e colaboradores (2005) aplicaram a espectrofotometria UV-Vis acoplada à calibração multivariada para especiação de antimônio (III) e antimônio (V), utilizando pirogallol como agente complexante. Na etapa de calibração, a média do erro absoluto de previsão foi 4,8% para o Sb (V) e 0,8% no caso do Sb (III). Na análise da amostra comercial, os autores obtiveram valores de Sb (V) e Sb (III) concordantes com o valor de Sb total obtido via ICP-MS e também especificado pelo fabricante.

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

A necessidade de se mostrar confiabilidade em análises químicas está sendo cada vez mais exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis, é necessário que ele passe por uma avaliação denominada validação, fundamental para a implementação de um sistema de controle de

qualidade em laboratórios de análises (RIBANI *et al.*, 2004).

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, no caso deste trabalho, a determinação quantitativa de princípios ativos em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

De modo geral, a metodologia desenvolvida deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão e exatidão adequados à análise.

Os testes são classificados em quatro categorias, segundo sua finalidade:

- Categoria I: Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas;
- Categoria II: Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas;
- Categoria III: Testes de performance;
- Categoria IV: Testes de identificação.

Para cada categoria há um conjunto de testes que deve ser realizado, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 01: Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

FONTE: ANVISA, 2003.

2.4.1 Especificidade e Seletividade

O parâmetro especificidade indica a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto, em presença de outros componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI *et al.*, 2004).

2.4.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 de acordo com a ANVISA (2003) e maior que 0,90 pelo INMETRO (2003).

2.4.3 Intervalo

O intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, dependendo de sua aplicação. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas, quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003). Para o controle de qualidade de matérias-primas ou produtos ou formas farmacêuticas o intervalo deve ter alcance de 80% a 120% da concentração teórica do teste.

2.4.4 Precisão

A precisão expressa o grau de concordância entre os resultados em uma série de medidas feitas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas (BRAGA e POPPI, 2004). Em geral, é considerada em três níveis (ANVISA, 2003):

- Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Recomenda-se um mínimo de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método (três concentrações em triplicatas) ou um mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste;
- Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um intervalo mínimo de dois dias.
- Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

A precisão de um método analítico pode ser expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Onde DP = desvio padrão e CMD = concentração média determinada.

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% (ANVISA, 2003).

2.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004).

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis (ANVISA, 2003):

- **Fármacos:** Pela aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;
- **Forma Farmacêutica:** Pela análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito. Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade. Em geral, é verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando a faixa linear do método (três concentrações em triplicatas), sendo expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2003):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

2.4.6 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta frente a variações (INMETRO, 2003), ou seja, a capacidade que este tem de resistir a pequenas e deliberadas mudanças dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Quando constatado a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Os principais parâmetros que devem ser considerados na determinação da robustez de um método espectrofotométrico são: variação do pH da solução, temperatura e diferentes fabricantes de solventes (ANVISA, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma metodologia analítica para determinação da associação Ácido Kójico e Hidroquinona em dermocosméticos, utilizando-se a espectrofotometria na região do visível associada a métodos de calibração multivariada, principalmente Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Otimizar a reação de complexação entre o Ácido Kójico e o íon férrico, principalmente em relação a quantidade de complexante (Fe^{3+}) e pH;
- ii. Determinar a estequiometria da reação de complexação entre o Ácido Kójico e o íon férrico utilizando-se o método da variação contínua (método de Job);
- iii. Desenvolver as metodologias espectrofotométricas de curva analítica, princípio da aditividade espectrofotométrica e primeira derivada para determinação de Ácido Kójico e Hidroquinona através de reações de complexação;
- iv. Desenvolver e otimizar modelos de calibração multivariada (PLSR) para a determinação dos analitos de interesse;
- v. Testar a capacidade de previsão dos modelos obtidos (metodologia convencional e multivariada), por meio de um conjunto de validação externa;
- vi. Validar a metodologia analítica multivariada desenvolvida, segundo os critérios da ANVISA;
- vii. Aplicar a metodologia na determinação de amostras de dermocosméticos comercializados em farmácias de manipulação da região.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os padrões de hidroquinona e ácido kójico (5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) foram de grau farmacêutico, fornecidos pelos laboratórios SP Farma e All Chemistry, respectivamente.

O Cloreto férrico hexaidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com teor 97,0-102,0% foi industrializado por VETEC Química Fina LTDA e os demais reagentes utilizados foram de grau analítico PA.

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

4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

4.2.1 Solução trabalho de Ácido Kójico

Uma solução de ácido kójico (MM:142,11g/mol) na concentração de $5,0\text{E}-03 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em balão volumétrico de 50,0 mL com água destilada.

4.2.2 Solução trabalho de Hidroquinona

Uma solução de hidroquinona (MM:110,11g/mol) na concentração de $1,0\text{E}-03 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em balão volumétrico de 100,0 mL com água destilada.

4.2.3 Soluções trabalho de Cloreto Férrico

Soluções de cloreto férrico hexaidratado (MM: 270,30g/mol) de diferentes

concentrações foram preparadas em balões volumétricos com água destilada. A Tabela 02 indica as concentrações, massas e volumes utilizados para cada etapa experimental.

Tabela 02: Concentrações das soluções trabalho utilizadas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com respectivas massas, volumes e etapas experimentais.

Concentração (mol L ⁻¹)	Massa (g)	Volume (mL)	Etapas experimental
1,5E-03	0,0235	50	Curva Analítica da Hidroquinona
5,0E-03	0,0676	50	Método de Job
5,05E-03	0,0682	50	Planejamento Fatorial 2 ²
8,0E-03	0,1081	50	Estudo Cinético
8,5E-03	0,1149	50	Deslocamento do Planejamento
1,0E-02	0,2703	100	Curva Analítica do Ácido Kójico e Misturas dos Conjuntos de Calibração e Validação

4.2.4 Soluções trabalho de 1,10-fenantrolina

Soluções de 1,10-fenantrolina (MM:198,22g/mol) foram preparadas nas concentrações: 4,0E-03 mol L⁻¹ para construção da curva analítica da hidroquinona e 6,0E-03 mol L⁻¹ para o desenvolvimento da metodologia multivariada. Para tal procedimento, dissolveu-se 1,10-Fenantrolina em etanol (usando-se 10% do volume total da solução) e diluiu-se em balão volumétrico com água destilada.

4.2.5 Tampão Clark Lubs

Preparou-se uma solução 1,0E-03 mol L⁻¹ de cloreto de potássio (MM:74,55g/mol) em pH 3,0. Para tal, pesou-se 0,3728 g de KCl e dissolveu-se em 190 mL de água destilada, em seguida, gotejou-se ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ até obtenção de pH 3,0 e transferiu-se para um balão de 200,0 mL acertando-se o menisco com água destilada (adaptação: MORITA e ASSUMPÇÃO, 1972).

4.3. ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

As análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu (2410 PC) - software UVPC v.3.91 (Shimadzu), utilizando cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico, sendo o espectro adquirido na região do visível, entre 350 e 800 nm. Excetuando-se a análise espectrofotométrica do planejamento fatorial, deslocamento do planejamento e estudo cinético que foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu modelo MultiSpec-1501.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

Realizou-se um planejamento fatorial 2^2 para otimização da reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico.

Para execução do planejamento, adicionou-se 1,000 mL da solução trabalho $5,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido kójico, ajustou-se os valores de pH adicionando-se HCl diluído, e finalmente adicionou-se alíquotas apropriadas de uma solução trabalho de $5\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, completando-se os balões volumétricos de 10,0 mL com água destilada. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

As variáveis e os níveis estudados são mostrados na Tabela 03.

Tabela 03: Variáveis e níveis estudados na reação de complexação entre ácido kójico e íon férrico.

Variáveis\Níveis	-	0	+
[FeCl ₃]	$2,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$	$5,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$	$7,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$
pH	3,0	4,0	5,0

Foram realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados com quintuplicata do ponto central (cálculo da estimativa do desvio), totalizando nove ensaios como é mostrado na Tabela 04.

Tabela 04: Ensaios experimentais para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados do planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	[FeCl ₃]	pH
01	-	-
02	+	-
03	-	+
04	+	+
05	0	0
06	0	0
07	0	0
08	0	0
09	0	0

Foram calculados os efeitos principais e de interação, observando-se a presença ou não de efeitos significativos.

4.4.1 Deslocamento do Planejamento Fatorial

Realizou-se um deslocamento do planejamento fatorial 2^2 utilizando concentrações maiores de cloreto férrico. Para isso, uma solução trabalho na concentração de $8,5\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi utilizada. As variáveis e os níveis estudados são mostrados na Tabela 05, sendo que as combinações possíveis desses novos níveis são idênticas ao mostrado na Tabela 04.

Tabela 05: Variáveis e Níveis estudados no deslocamento do planejamento fatorial 2^2 .

Variáveis\Níveis	-	0	+
[FeCl ₃]	$7,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$	$8,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$	$9,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$
pH	3,0	4,0	5,0

4.5 ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO AK-FE(III)

Para realização do estudo cinético, adicionou-se alíquotas de 0,900 mL da solução trabalho $5,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido kójico, 1,000 mL da solução trabalho 8,0

$5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e completou-se os balões volumétricos de 10,0 mL com solução tampão Clark Lubs. Em seguida, as soluções foram submetidas a leitura espectrofotométrica, nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 minutos.

4.6 MÉTODO DA VARIAÇÃO CONTÍNUA (JOB)

Para determinação espectrofotométrica da estequiometria do complexo AK-Fe(III) utilizou-se o método da variação contínua ou método de Job (HARRIS, 2005). Conforme propõe o método, alíquotas das soluções estoque de ácido kójico e cloreto férrico de concentrações iguais a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram utilizadas. Como o número de mols deve ser mantido constante, fixou-se o volume total (solução de AK + solução de Fe[III]) em 1000 μL e variou-se a razão entre os volumes de ácido kójico e cloreto férrico, o que acarretou na variação da fração molar das espécies entre 0,1 e 0,9, conforme mostrado na Tabela 06. Completou-se o volume da solução final com tampão Clark Lubs ($\text{pH} = 3,0$) em balão volumétrico de 10,0 mL. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

Tabela 06: Ensaios do método da variação contínua para determinação da estequiometria do complexo entre o ácido kójico e o íon férrico.

Ensaio	Razão Molar (Fe:AK)	Alíquota (μL) (Fe/AK)	Fração Molar
01	9:1	900/100	0,900
02	4:1	800/200	0,800
03	3:1	750/250	0,750
04	2:1	667/333	0,667
05	1,5:1	600/400	0,600
06	1:1	500/500	0,500
07	1:1,5	400/600	0,400
08	1:2	333/667	0,333
09	1:3	250/750	0,250
10	1:4	200/800	0,200
11	1:9	100/900	0,100

O gráfico do método das variações contínuas foi obtido representando a

absorbância do complexo AK-Fe(III) em 494 nm *versus* a fração molar.

4.7 ANÁLISE DO ÁCIDO KÓJICO

Para construção da curva analítica do ácido kójico, foram realizadas diluições a partir da solução trabalho $5,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ de AK em balões volumétricos de 10,0 mL com uma faixa de concentração entre $5,0\text{E-}05$ e $9,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, adicionou-se solução tampão Clark Lubs (que também foi utilizada para acertar o menisco) e 800 μL da solução trabalho de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1,0\text{E-}02 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

Os gráficos da curva de calibração foram obtidos representando a absorbância *versus* a concentração AK. A 1ª derivada dos dados espectrais foi obtida com 09 pontos de alisamento derivando o espectro de absorbância *versus* o comprimento de onda de AK, e a curva analítica da derivada foi obtida representando a derivada da absorbância *versus* a concentração de AK. Para montagem dos gráficos utilizou-se o software Origin Pro 6.1®.

4.8 ANÁLISE DA HIDROQUINONA

Para construção da curva analítica da hidroquinona, preparou-se diluições a partir da solução trabalho de HQ em balões volumétricos de 10,0 mL com uma faixa de concentração entre $1,0\text{E-}05$ e $7,0\text{E-}05 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, adicionou-se solução tampão Clark Lubs (que também foi utilizada para acertar o menisco), 1300 μL da solução trabalho de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1,5\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ e 1200 μL da solução trabalho de 1,10-Fenantrolina $4,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

Os gráficos da curva de calibração foram obtidos representando a absorbância *versus* a concentração HQ. A 1ª derivada dos dados espectrais foi obtida com 09 pontos de alisamento derivando o espectro de absorbância *versus* o comprimento de onda de HQ, e as curvas analíticas das derivadas foram obtidas

representando a derivada da absorbância *versus* a concentração de HQ. Para montagem dos gráficos utilizou-se o software Origin Pro 6.1 ®.

4.9 ANÁLISE MULTIVARIADA

Para análise da mistura dos compostos adicionou-se alíquotas conhecidas das soluções trabalho de ácido kójico $5,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$ e hidroquinona $1,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, adicionou-se solução tampão Clark Lubs (que também foi utilizada para acertar o menisco), $1000 \mu\text{L}$ de solução de cloreto férrico $1,0\text{E-}02 \text{ mol L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{L}$ de solução trabalho de 1,10-fenantrolina $6,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$, em balões volumétrico de $10,0 \text{ mL}$. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

O conjunto de calibração constituiu-se por 25 misturas dos analitos de interesse, dentro da faixa de concentração de $5,0\text{E-}05$ a $2,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ para o Ácido Kójico e $1,0\text{E-}05$ a $7,0\text{E-}05 \text{ mol L}^{-1}$ para a Hidroquinona. O conjunto de validação constituiu-se por 07 misturas, sendo 03 dessas em triplicata, dentro da faixa de concentração utilizada no conjunto de calibração, totalizando 13 misturas conforme é ilustrado na Figura 11.

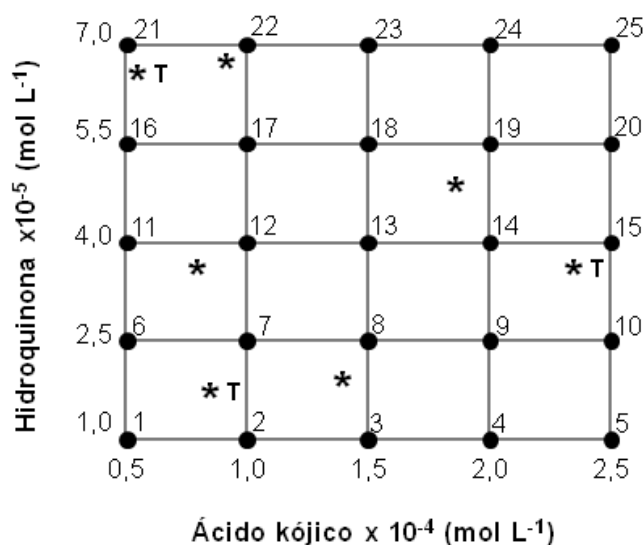


Figura 11: Planejamento experimental para obtenção das misturas dos conjuntos de calibração e validação (*=amostras do conjunto de validação e *T=amostra do conjunto de validação realizada em triplicata)

Para elaboração dos modelos de calibração multivariada empregou-se o pacote PLS-Toolbox 3.0, que opera em ambiente Matlab 6.1.

4.10 VALIDAÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO

O melhor modelo para determinação de ácido kójico e hidroquinona foi validado segundo critérios estabelecidos pela ANVISA. Os parâmetros analisados foram especificidade, linearidade, intervalo, precisão (intra-corrida e inter-corridas), exatidão e robustez.

4.10.1 Especificidade

A especificidade do modelo multivariado foi avaliada através do ensaio de recuperação em base gel, onde quantidades conhecidas de ácido kójico e hidroquinona padrão foram adicionadas ao veículo e depois determinadas.

Preparou-se três amostras de dermocosméticos contendo ambos analitos. Para tal, um saco plástico transparente foi acondicionado em um béquer de forma que possibilitasse a pesagem de materiais dentro dele. Pesou-se o ácido kójico, em seguida a hidroquinona, e por fim a base gel, de modo a totalizar cerca de 8,0 g de dermocosmético. Para cada uma destas amostras, a quantificação foi realizada em triplicata. Em cada ensaio, pesou-se uma determinada quantidade do dermocosmético (Tabela 07) em balão de 100 mL e diluiu-se com tampão Clark Lubs. Uma alíquota de 1000 μL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, sendo adicionada solução tampão (que também foi utilizada para acertar o menisco), 1000 μL de solução de cloreto férrico $1,0\text{E-}02 \text{ mol L}^{-1}$ e 1000 μL de solução trabalho de 1,10-fenantrolina $6,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

Tabela 07: Ensaios do método de recuperação para determinação da especificidade.

Ensaio	Amostras dermocosméticas	Massa pesada (g)	Concentração (mol L ⁻¹)	
			AK	HQ
01	AK 2%	0,3722	5,24E-05	6,74E-05
02		0,3698	5,21E-05	6,70E-05
03	HQ 2%	0,3651	5,15E-05	6,62E-05
04	AK 2%	0,7572	1,06E-04	6,92E-05
05		0,7363	1,03E-04	6,73E-05
06	HQ 1%	0,7382	1,04E-04	6,75E-05
07	AK 4%	0,3637	1,02E-04	3,33E-05
08		0,3673	1,03E-04	3,36E-05
09	HQ 1%	0,3673	1,03E-04	3,36E-05

4.10.2 Linearidade e Intervalo

Para avaliação da linearidade do modelo multivariado, construiu-se um gráfico considerando os valores reais de concentração das amostras em função dos valores previstos pelo modelo, durante o procedimento de validação cruzada. Esta curva considerou os valores de concentração das 25 amostras que constituíam o conjunto de calibração do modelo multivariado. O intervalo de concentração estudado foi a faixa do modelo multivariado, ou seja, de $5,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para o ácido kójico e $1,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para hidroquinona.

4.10.3 Precisão

Para avaliação da precisão foram realizados ensaios de repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corridas). Para tais ensaios, foram preparadas 07 misturas sintéticas das espécies de interesse (conjunto de validação externa), sendo 03 em triplicata, contemplando o intervalo linear do método.

Em cada ensaio de repetibilidade, adicionou-se alíquotas (Tabela 08) conhecidas das soluções trabalho de ácido kójico $5,0\text{E-}03$ mol L⁻¹ e hidroquinona $1,0\text{E-}03$ mol L⁻¹. Posteriormente, adicionou-se solução tampão Clark Lubs (que

também foi utilizada para acertar o menisco), 1000 µL de solução de cloreto férrico $1,0\text{E-}02 \text{ mol L}^{-1}$ e 1000 µL de solução trabalho de 1,10-fenantrolina $6,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$, em balões volumétrico de 10,0 mL. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

Tabela 08: Concentrações de ácido kójico e hidroquinona utilizadas nos ensaios de precisão.

Ensaio	Volume AK (µL)	[AK] (mol L^{-1})	Volume HQ (µL)	[HQ] (mol L^{-1})
01*	110	5,50E-05	670	6,70E-05
02*	180	9,00E-05	125	1,25E-05
03*	480	2,40E-04	375	3,75E-05
04	380	1,90E-04	475	4,75E-05
05	195	9,75E-05	690	6,90E-05
06	170	8,50E-05	390	3,90E-05
07	280	1,40E-04	175	1,75E-05

* Realizados em triplicata

Para o ensaio de precisão intermediária, foram refeitos os procedimentos de repetibilidade em dois dias diferentes, por analistas diferentes, no mesmo laboratório e equipamentos.

A precisão foi expressa na forma de desvio padrão relativo, considerando-se satisfatórios valores inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

4.10.4 Exatidão

Com os resultados das previsões para as amostras sintéticas do conjunto de validação externa, foi possível verificar a exatidão da metodologia multivariada utilizando-se a raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP) e erro relativo médio. A exatidão também foi avaliada por meio do ensaio de recuperação descrito anteriormente no item 4.10.1 especificidade.

4.10.5 Robustez

O único parâmetro de robustez avaliado para a metodologia multivariada foi a influência da temperatura. Preparou-se uma solução em balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se 300 µL da solução de ácido kójico $5,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$, 400 µL da solução de hidroquinona $1,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$, 1000 µL da solução de FeCl_3 $1,0\text{E-}02 \text{ mol L}^{-1}$ e finalmente 1000 µL da solução de 1,10-fenantrolina $6,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$. Para acertar o menisco, utilizou-se tampão Clark Lubs (pH=3,0). Submeteu-se a solução a leitura espectrofotométrica em diferentes temperaturas (5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C) utilizando-se um banho termostático (Tecnal TE-184). Os resultados foram avaliados na forma de um gráfico contendo os espectros da solução em diferentes temperaturas e a partir da determinação da concentração de AK e HQ dessas amostras pelo modelo multivariado sob validação.

4.11 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

Para avaliação dos modelos multivariados desenvolvidos, foram analisadas amostras reais contendo a associação em estudo, em base gel. As oito formulações comerciais, contendo diferentes concentrações de ácido kójico e hidroquinona, foram obtidas em farmácias de manipulação na região de Ponta Grossa e Curitiba/PR.

Para análise, pesou-se uma quantidade do dermocosmético (Tabela 09) em balão de 100 mL diluiu-se com tampão Clark Lubs, agitou-se vigorosamente com agitador Vortex (B. Braun Biotech International, modelo Certomat MV). Transferiu-se uma alíquota de 1000 µL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se solução tampão (que também foi utilizada para acertar o menisco), 1000 µL de solução de cloreto férrico $1,0\text{E-}02 \text{ mol L}^{-1}$ e 1000 µL de solução trabalho de 1,10-fenantrolina $6,0\text{E-}03 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, as soluções foram submetidas à análise espectrofotométrica.

Tabela 09: Ensaios para análise das amostras reais de dermocosméticos (base gel), obtidos em farmácias de manipulação da região de Ponta Grossa e Curitiba/PR.

Amostra	Concentração declarada		Massa pesada (g)
	AK	HQ	
01	2,0 %	2,0 %	0,3645
02	2,0 %	1,0 %	0,7284
03	2,0 %	2,0 %	0,3676
04	2,0 %	2,0 %	0,3651
05	2,0 %	2,0 %	0,3668
06	1,0 %	1,0 %	0,7299
07	2,0 %	2,0 %	0,3701
08	2,0 %	1,0 %	0,7364

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ÁCIDO KÓJICO

Com base na literatura, sabe-se que o ácido kójico reage com o íon férrico na razão molecular 3 para 1 na faixa de pH de 5 a 6, produzindo um complexo laranja-amarelado, com absorção máxima em torno de 440 nm, podendo ser utilizado na determinação espectrofotométrica de ferro (MOSS e MELLON, 1941; MEHLING e SHEPHERD, 1949). Portanto, no presente projeto, empregou-se o complexo formado entre o ácido kójico e o íon férrico para determinação espectrofotométrica do ácido kójico em misturas com hidroquinona.

5.1.1 Resultados da otimização via Planejamento Fatorial

Para otimizar a reação de complexação entre o ácido kójico e o íon ferro (III), em valores de pH's menores que os relatados na literatura (a fim de evitar a hidrólise do íon férrico), realizou-se um planejamento fatorial 2^2 com quintuplicata do ponto central (cálculo da estimativa do desvio). Os resultados da otimização via planejamento fatorial são ilustrados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados da otimização via planejamento fatorial 2^2 da reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico.

Ensaio	[FeCl ₃]	pH	Absorbância
01	-	-	0,45663
02	+	-	0,53313
03	-	+	0,49389
04	+	+	0,53964
05	0	0	0,53531
06	0	0	0,53113
07	0	0	0,53206
08	0	0	0,51952
09	0	0	0,52574

Os resultados da otimização mostram que os efeitos principais: concentração de cloreto férrico e pH, assim como o efeito de interação foram significativos (Tabela 11), considerando-se a estimativa do desvio de 0,0132 ($0,0062 \times 2,132$), em um nível de 90% de confiança.

Tabela 11: Efeitos calculados para otimização via planejamento fatorial 2^2 da reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico.

	Efeito Principal	Efeito de interação
[FeCl ₃]	+0,0611	-
pH	+0,0219	-
[FeCl ₃] x pH	-	-0,0154

Uma vez que o efeito de interação é significativo, os efeitos principais não podem ser interpretados individualmente. Assim, o efeito de interação [FeCl₃] x pH pode ser melhor visualizado na interpretação geométrica mostrada na Figura 12.

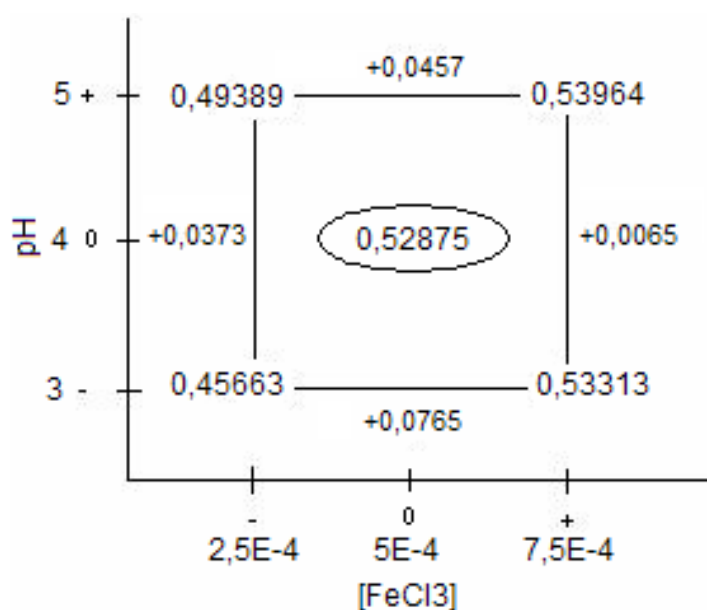


Figura 12: Interpretação geométrica do efeito de interação [FeCl₃] x pH.

Nesta figura foi possível observar que em $2,5\text{E}-04 \text{ mol L}^{-1}$ de FeCl₃ (nível -) um aumento de 0,0373 u.a. ocorre quando varia-se o pH do nível menor para o nível maior, ou seja, do pH 3,0 para o pH 5,0. No entanto, em $7,5\text{E}-04 \text{ mol L}^{-1}$ de FeCl₃ (nível +) um aumento menor no valor de absorbância foi observado quando varia-se

o pH, evidenciando que o efeito do pH depende da concentração de cloreto férrico utilizada. Esse aumento menor no valor de absorvância para uma concentração maior de FeCl_3 , provavelmente está relacionado com a hidrólise do íon férrico, que se inicia em $\text{pH} \approx 5$ (NURCHI *et al.*, 2010). Ou seja, mesmo com o aumento da concentração de FeCl_3 , o aumento do pH diminui a disponibilidade de íons Fe^{3+} em solução e limita assim, a formação do complexo com o AK.

Em função do efeito do pH diminuir em concentrações maiores de cloreto férrico, conforme o observado nesse planejamento, realizou-se um segundo planejamento com o propósito de certificar-se dessa tendência e obter as condições otimizadas da reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico.

5.1.2 Deslocamento do Planejamento Fatorial

Para certificar a tendência observada no planejamento anterior e otimizar a quantidade necessária de cloreto férrico que proporcione a maior complexação do analito de interesse, fez-se o deslocamento do planejamento 2^2 para concentrações de FeCl_3 maiores. Sendo assim, os níveis (-) e (+) da concentração de FeCl_3 , passaram a ser $7,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ e $9,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, utilizando-se os mesmos pHs e também com quintuplicata do ponto central para cálculo da estimativa do desvio. Os resultados são ilustrados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados do deslocamento do planejamento fatorial 2^2

Ensaio	$[\text{FeCl}_3]$	pH	Absorvância
01	-	-	0,58069
02	+	-	0,59458
03	-	+	0,59347
04	+	+	0,59435
05	0	0	0,59655
06	0	0	0,59596
07	0	0	0,59690
08	0	0	0,60415
09	0	0	0,58413

Através dos cálculos dos efeitos e considerando-se a estimativa do desvio de

0,0153 ($0,0072 \times 2,132$), pode-se constatar que os efeitos principais (concentração de cloreto férrico e pH) e o efeito de interação não foram significativos (Tabela 13), considerando-se um nível de confiança de 90%.

Tabela 13: Efeitos calculados para o planejamento 2^2 deslocado.

	Efeito Principal	Efeito de interação
[FeCl ₃]	+0,0074	-
pH	+0,0063	-
[FeCl ₃] x pH	-	-0,0065

Os resultados confirmam a tendência observada anteriormente. Pode-se concluir que para concentrações de FeCl₃ acima de $7,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$, é possível utilizar qualquer um dos pHs estudados: 3,0, 4,0 ou 5,0, já que os efeitos observados são menores que a estimativa do desvio.

A importância de se conduzir um planejamento experimental é enfatizada por Bruns (2003), pois auxilia a planejar detalhadamente um experimento, promove uma redução dos custos operacionais das análises e garante que os resultados contenham informações relevantes para a solução do problema.

Em função desses resultados, optou-se por utilizar nas análises $8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto férrico e um tampão inorgânico conhecido como Clark-Lubs (HCl/KCl) em pH 3,0. Outras soluções tampão foram testadas, tais como: tampão fosfato, tampão oxalato, tampão tartarato, e tampão citrato. No entanto, todos eles apresentaram reações de complexação com os íons ferro (II) e ferro (III), sendo este último, o complexante proposto para este trabalho.

5.1.3 Resultados obtidos através do estudo cinético

Realizou-se um estudo cinético da reação entre o ácido kójico e o íon férrico, nos intervalos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27 minutos, para avaliar o tempo necessário para que a reação de complexação se processasse por completo. Os espectros na região do visível obtidos são mostrados na Figura 13.

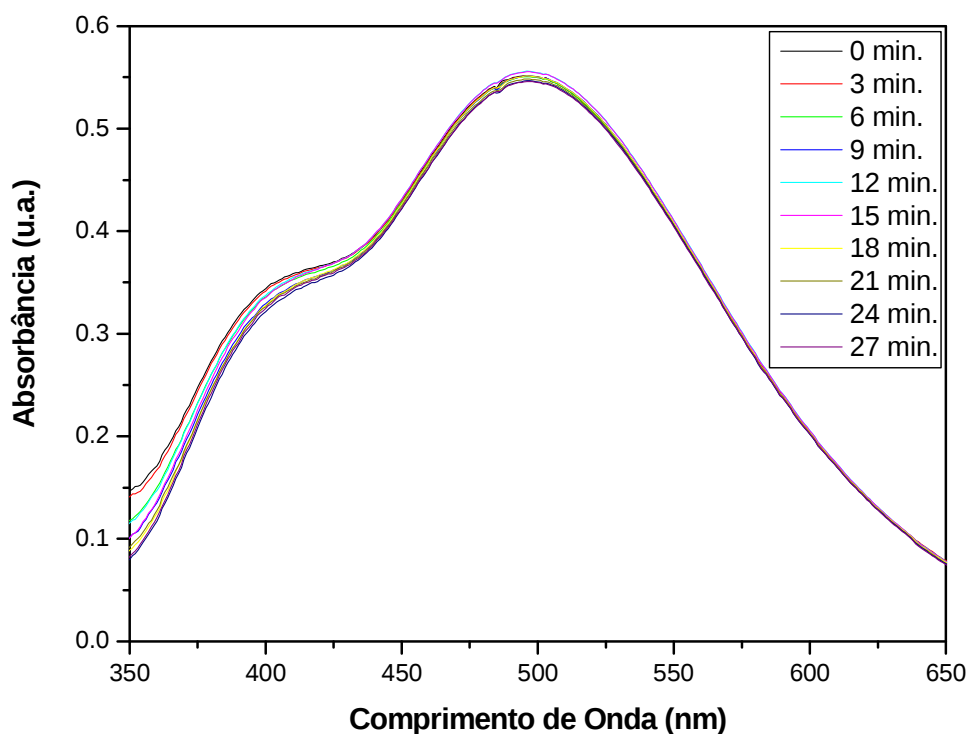


Figura 13: Espectros de absorção na região do visível do complexo ácido kójico ($4,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e íon férrico ($8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) nos intervalos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27 minutos

Os espectros mostrados na Figura 13 evidenciam que a complexação entre o ácido kójico e o íon férrico ocorreu por completo desde a primeira leitura. Isso indica que a reação de complexação é rápida, já que não foi possível observar diferenças significativas de absorção entre as leituras.

5.1.4 Estequiometria do complexo AK-Fe(III)

Considerando um equilíbrio onde vários complexos podem ser formados, o método da variação contínua ou método de Job, nos permite identificar a estequiometria do complexo predominante (HARRIS, 2005). Assim, utilizou-se este método para determinação espectrofotométrica da estequiometria do complexo formado entre o ácido kójico e o íon férrico.

O procedimento considera a mistura de alíquotas equimolares de AK e Fe (III) seguidas pela diluição a um mesmo volume, tal que a concentração total (AK +

Fe(III)) permaneça constante. A absorbância máxima é alcançada na composição correspondente à estequiometria do complexo predominante (HARRIS, 2005). Os espectros de absorção na região do visível obtidos através do método da variação contínua são mostrados na Figura 14.

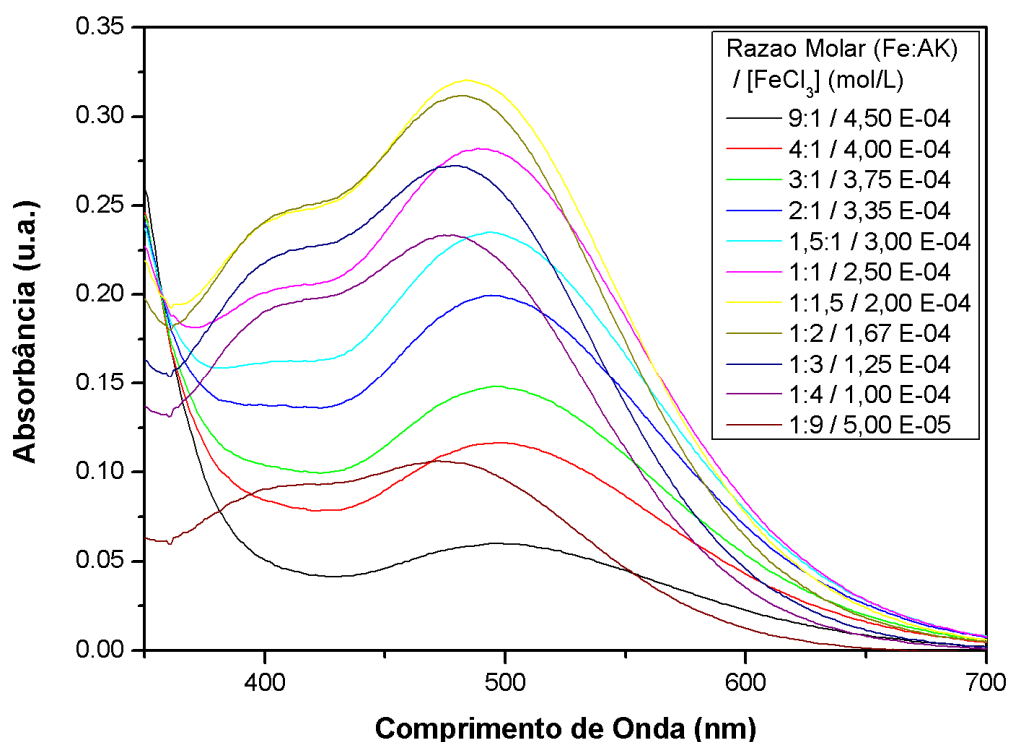


Figura 14: Espectros de absorção na região do visível dos complexos formados entre ácido kójico e ferro (III) pelo método da variação contínua

Observou-se que até a proporção 1:1,5 (Fe(III):AK) houve um aumento linear da absorbância do complexo à medida que a concentração de cloreto férrico diminuiu. No entanto, a partir da concentração $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de FeCl₃, a absorbância do complexo também diminuiu à medida que a concentração de cloreto férrico diminuiu. Estes resultados deram origem a um gráfico da fração molar *versus* a absorbância do complexo AK-Fe(III) em 494 nm, o qual é mostrado na Figura 15.

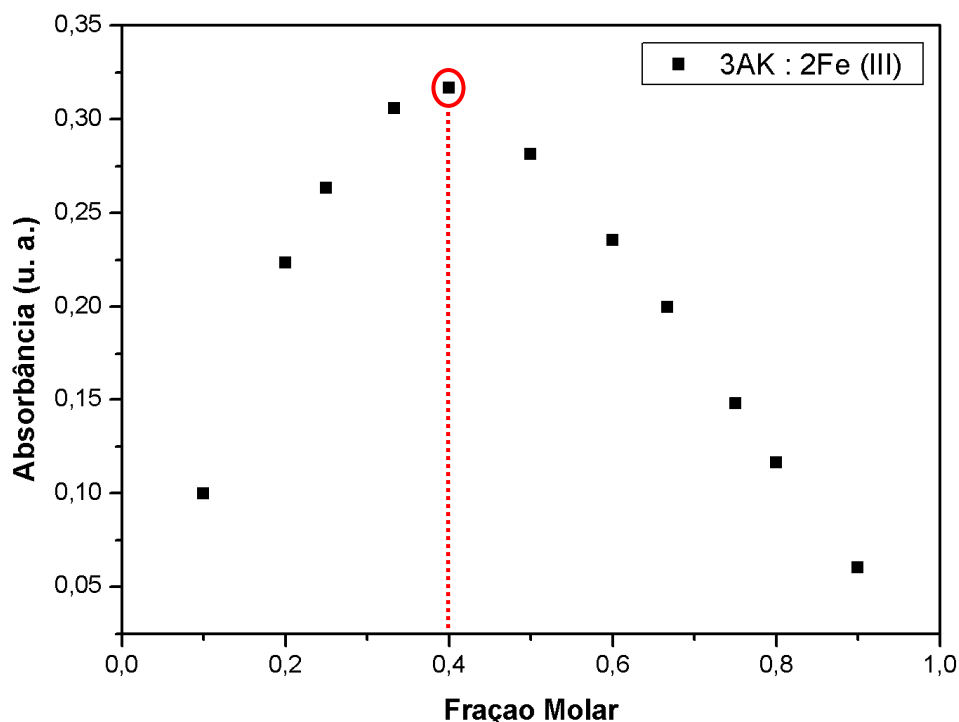


Figura 15: Gráfico da fração molar vs. a absorbância em 494 nm do complexo formado entre o ácido kójico e o ferro (III)

No gráfico observou-se que o valor máximo de absorção no comprimento de onda monitorado corresponde a fração molar de 0,400, o que indica que o complexo possui estequiometria de 1:1,5, ou seja, 2 moléculas de Fe(III) para cada 3 moléculas de ácido kójico. A estequiometria resultante do método de Job é diferente da estequiometria 1Fe(III) : 3AK recentemente reportada por NURCHI e colaboradores (2010) em um estudo envolvendo os complexos de ácido kójico e seu derivado (6-[5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona]-5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) com os íons metálicos trivalentes Fe(III) e Al(III). Neste trabalho foram determinadas as constantes de protonação do ácido kójico, bem como, as constantes de formação do complexo $[\text{Fe}(\text{AK})_3]$ utilizando-se técnicas potenciométricas e espectrofotométricas (esta última processada por Análise Envolvendo Fatores). Além disso, cristais do complexo $[\text{Fe}(\text{AK})_3]$ foram sintetizados e submetidos a análise de difração de raio-x que permitiu aos autores determinarem a estrutura do complexo.

5.1.5 Curva Analítica do Ácido Kójico

Em função dos resultados obtidos através do planejamento fatorial 2^2 e do deslocamento do planejamento, a curva analítica do ácido kójico foi obtida empregando-se a concentração $8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto férrico e tampão Clark Lubs em pH 3,0. Através da análise espectrofotométrica do complexo $\text{AK}_3\text{Fe(III)}_2$, observou-se uma banda de máxima absorção no comprimento de onda 494 nm, como é mostrada na Figura 16.

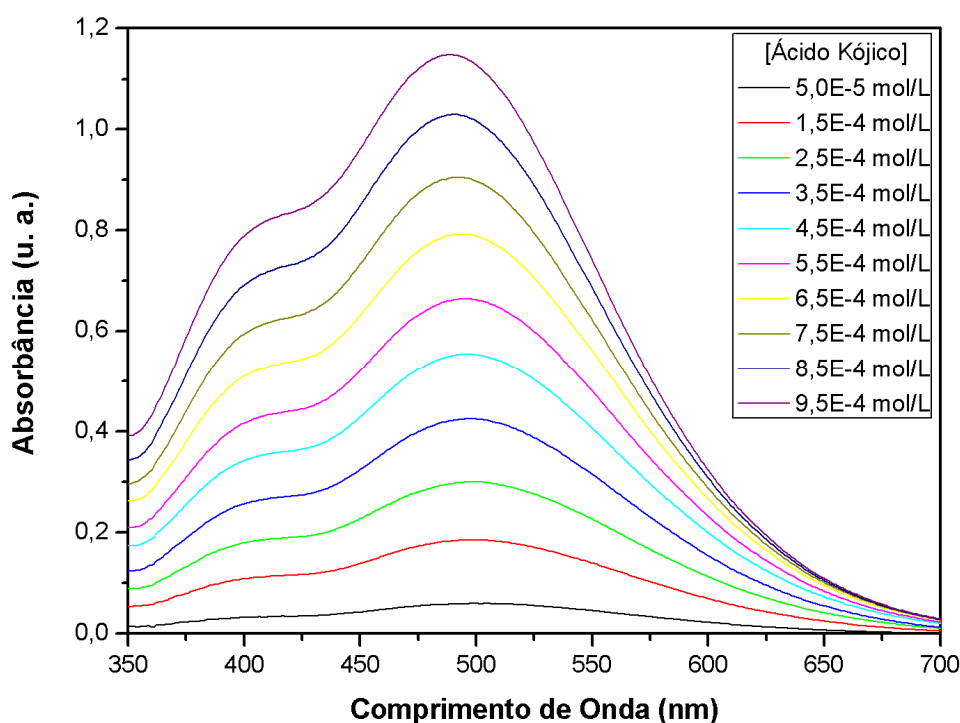


Figura 16: Espectros de absorção na região do visível do complexo ácido kójico e íon férrico ($8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 3,0

Utilizou-se o comprimento de onda (494 nm) para a construção da curva analítica, sendo que a lei de Beer é obedecida nos limites de concentração entre $5,0\text{E-}05$ e $9,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$, indicando uma ampla faixa linear. A equação da reta é mostrada na Figura 17, na qual se teve um alto coeficiente de correlação.

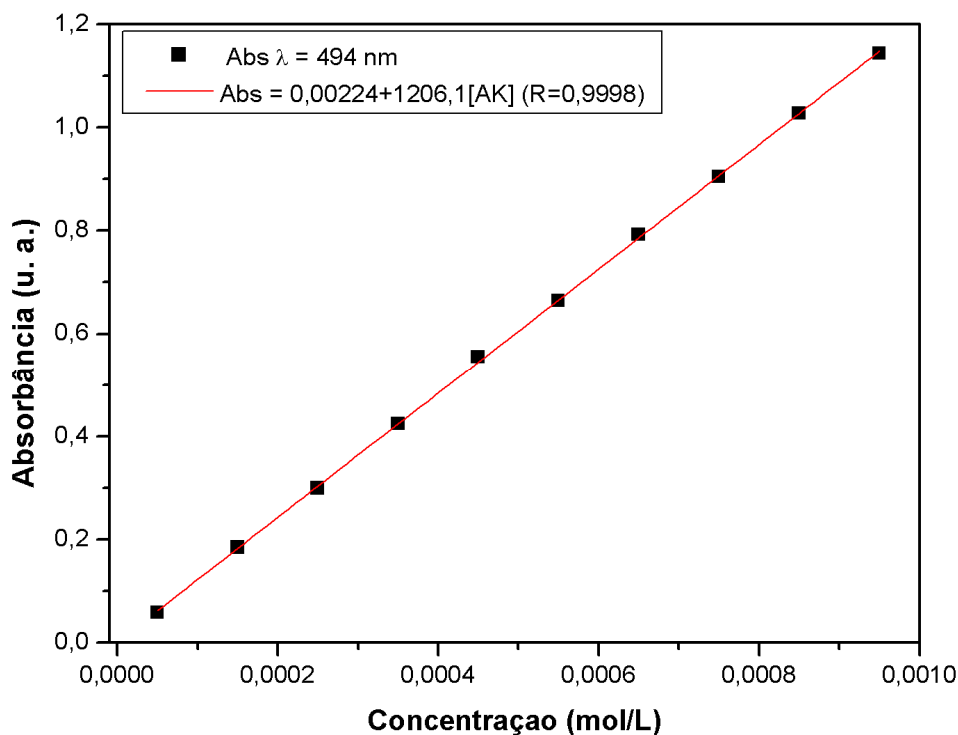


Figura 17: Curva analítica para determinação de ácido kójico em 494 nm (absorbância x concentração de AK)

5.2 HIDROQUINONA

Ao contrário do complexo $\text{AK}_3\text{Fe(III)}_2$, a reação de complexação para a hidroquinona não necessitou de otimização, uma vez que se trata de uma técnica bastante conhecida, relatada inclusive em diversos livros (SKOOG, 1963; OHLWEILER, 1974; HARRIS, 2005). Esta metodologia baseia-se na redução do íon Fe^{3+} a Fe^{2+} pela ação da hidroquinona. A quantidade de Fe^{2+} gerada pode ser determinada através da sua reação com 1,10-fenantrolina gerando um complexo vermelho-alaranjado, $[(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3\text{Fe}]^{2+}$ formado quantitativamente na faixa de pH 2 a 9 (abaixo de pH 2 a coloração se desenvolve lentamente e é mais fraca), estável por longos períodos, com absorção máxima em torno de 510 nm, (OHLWEILER, 1974). A reação de complexação é ilustrada na Figura 18.

Utilizou-se este comprimento de onda (510 nm) para a construção da curva analítica, onde se observou que a lei de Beer é obedecida nos limites de concentração entre $1,0\text{E-}05$ e $7,0\text{E-}05 \text{ mol L}^{-1}$. A equação da reta é mostrada na Figura 20, na qual também se observa um alto coeficiente de correlação.

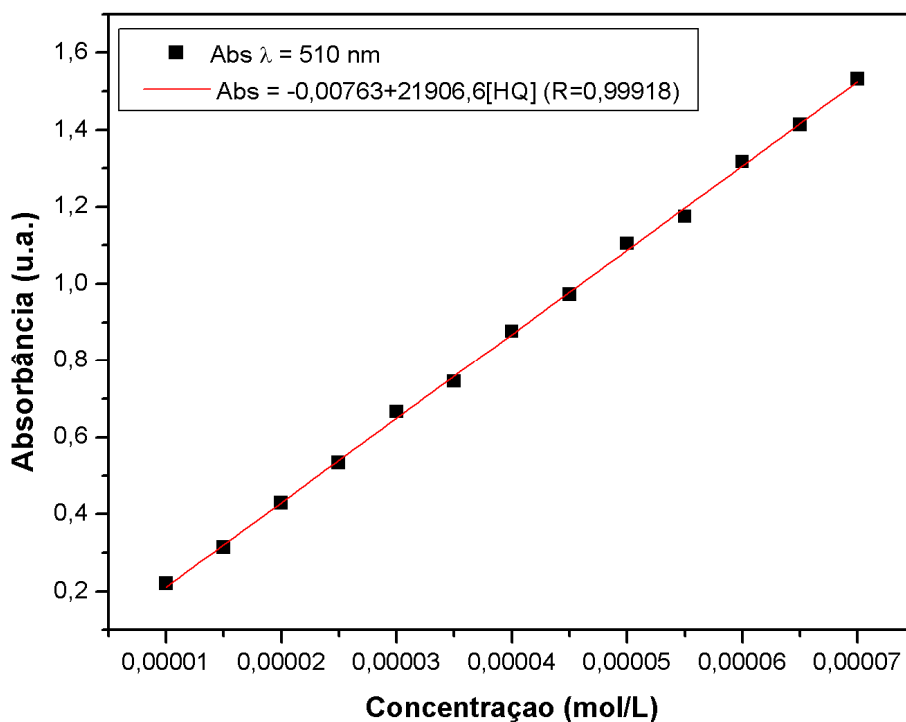


Figura 20: Curva analítica para determinação de hidroquinona em 510 nm (absorbância x concentração de HQ)

Analisando as equações das retas obtidas (Figuras 17 e 20), pode-se observar que o coeficiente angular da hidroquinona é 18 vezes maior que o coeficiente angular do ácido kójico, indicando que a metodologia analítica para determinação de hidroquinona é bem mais sensível do que àquela utilizada para a determinação de ácido kójico.

Devido à proximidade dos comprimentos de onda onde ocorre a máxima absorção dos compostos (Figura 21), 494 nm para AK e 510 nm para HQ, torna-se inviável a resolução dos sinais de absorbância, o que dificulta a determinação simultânea dos analitos em misturas sem nenhuma manipulação dos dados espectrais.

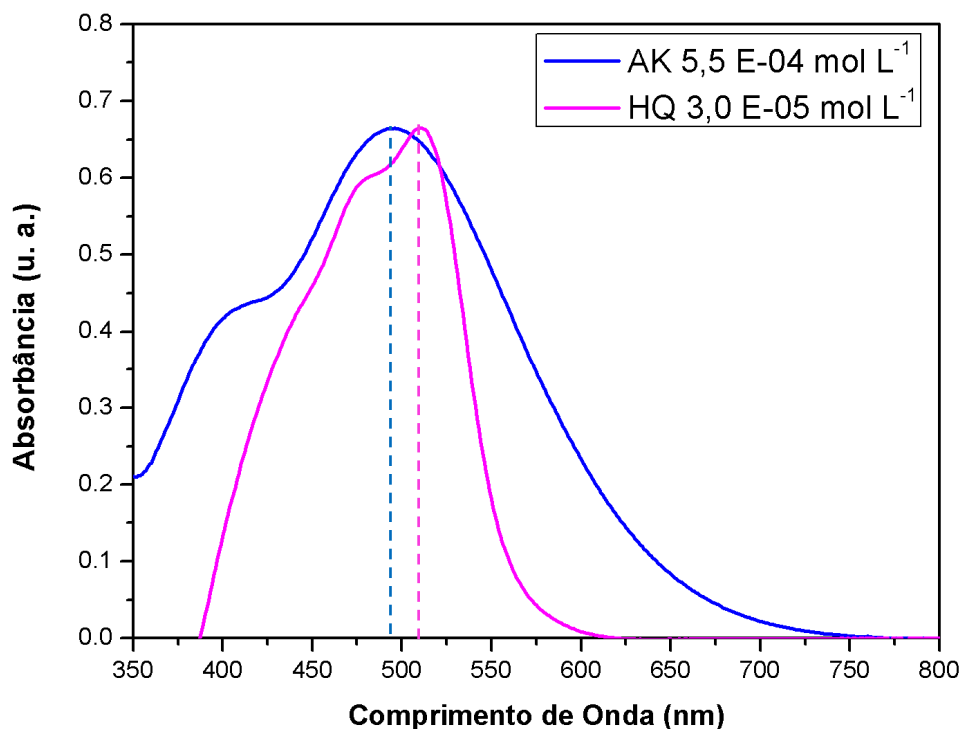


Figura 21: Espectros de absorção do complexo Fe^{+2} e 1,10-fenantrolina para determinação indireta de HQ ($3,0\text{E-}05 \text{ mol L}^{-1}$) e do complexo AK ($5,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e Fe^{+2} em pH 3,0

5.3 ÁCIDO KÓJICO E HIDROQUINONA

Determinou-se quantitativamente ácido kójico e hidroquinona quando associados pelos métodos convencionais de análise (curva analítica, princípio da aditividade espectrofotométrica e primeira derivada), os quais foram comparados aos resultados obtidos via calibração multivariada (PLSR).

A capacidade de previsão de cada uma das metodologias univariada ou multivariada foi avaliada por um conjunto de validação externa contendo 07 misturas sintéticas das espécies de interesse, sendo 03 delas em triplicata. O parâmetro quantitativo utilizado para avaliar esta capacidade de previsão foi a raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP).

$$\text{RMSEP} = (\Sigma(C_{\text{REAL}} - C_{\text{PREVISTA}})^2/n)^{1/2}$$

5.3.1 Curva analítica convencional

Utilizando-se a equação da reta: $Abs=0,00224+1206,1[AK]$, mostrada anteriormente na Figura 17, pôde-se determinar a concentração de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação, obtendo-se um RMSEP de $4,63E-04 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados de cada amostra do conjunto de validação são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados obtidos via curva analítica para determinação de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação externa

Valor Real (mol L^{-1})	Valor Previsto (mol L^{-1})	Erro Absoluto (mol L^{-1})	Erro Relativo (%)	RMSEP (mol L^{-1})
5,50E-05	6,79E-04	6,24E-04	1135	3,89E-07
5,50E-05	6,74E-04	6,19E-04	1126	3,83E-07
5,50E-05	6,79E-04	6,24E-04	1135	3,89E-07
9,00E-05	2,45E-04	1,55E-04	172	2,40E-08
9,00E-05	2,51E-04	1,61E-04	179	2,59E-08
9,00E-05	2,39E-04	1,49E-04	166	2,22E-08
2,40E-04	6,91E-04	4,51E-04	188	2,03E-07
2,40E-04	6,86E-04	4,46E-04	186	1,99E-07
2,40E-04	6,93E-04	4,53E-04	189	2,05E-07
1,90E-04	7,00E-04	5,10E-04	268	2,60E-07
9,75E-05	7,60E-04	6,63E-04	679	4,39E-07
8,50E-05	5,27E-04	4,42E-04	520	1,95E-07
1,40E-04	3,74E-04	2,34E-04	167	5,48E-08
Médio			470	4,63E-04

Em seguida, utilizando-se a equação da reta: $Abs=-0,00763+21906,6[HQ]$, mostrada anteriormente na Figura 20, pôde-se determinar a concentração de hidroquinona nas misturas do conjunto de validação, obtendo-se um RMSEP de $1,52E-05 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados obtidos via curva analítica para determinação de hidroquinona nas misturas do conjunto de validação externa.

Valor Real (mol L ⁻¹)	Valor Previsto (mol L ⁻¹)	Erro Absoluto (mol L ⁻¹)	Erro Relativo (%)	RMSEP (mol L ⁻¹)
6,70E-05	3,98E-05	-2,72E-05	-40,6	7,40E-10
6,70E-05	3,95E-05	-2,75E-05	-41,0	7,56E-10
6,70E-05	3,99E-05	-2,71E-05	-40,4	7,34E-10
1,25E-05	1,41E-05	1,60E-06	12,8	2,56E-12
1,25E-05	1,45E-05	2,00E-06	16,0	4,00E-12
1,25E-05	1,38E-05	1,30E-06	10,4	1,69E-12
3,75E-05	3,92E-05	1,70E-06	4,53	2,89E-12
3,75E-05	3,89E-05	1,40E-06	3,73	1,96E-12
3,75E-05	3,92E-05	1,70E-06	4,53	2,89E-12
4,75E-05	4,01E-05	-7,40E-06	-15,6	5,48E-11
6,90E-05	4,43E-05	-2,47E-05	-35,8	6,10E-10
3,90E-05	3,07E-05	-8,30E-06	-21,3	6,89E-11
1,75E-05	2,13E-05	3,80E-06	21,7	1,44E-11
Médio			20,6	1,52E-05

Como já era esperado, devido à grande sobreposição espectral dos sinais analíticos das espécies de interesse (Figura 21), foram obtidos altos erros relativos para a determinação de ambos os analitos através da curva analítica. Também é possível observar que na maioria das previsões os erros relativos são positivos (principalmente no caso do AK), ou seja, os valores previstos são maiores que os valores reais, já que a absorbância utilizada para a determinação é uma soma das absorbâncias de ambos os complexos formados. Sendo assim, ao ser substituída na equação da reta, é como se a soma das absorbâncias fosse atribuída somente a um deles.

Além disso, é possível destacar que na determinação de ácido kójico obteve-se erro relativo de até 1135% bem superior aos 41% obtido para hidroquinona. Esta discrepância na capacidade de previsão dos clareadores provavelmente é decorrente da diferença significativa de sensibilidade de ambas as metodologias, conforme constatado anteriormente.

5.3.2 Princípio da aditividade espectrofotométrica (Método de Vierordt)

O princípio da aditividade espectrofotométrica ou método de Vierordt (ABDELLATEF *et al.*, 2007) está baseado na lei de Beer que pode ser aplicada a um meio contendo mais de uma espécie de substâncias absorventes, sendo que em cada comprimento de onda a seguinte relação é verdadeira:

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

A absorvância total de uma solução em um determinado comprimento de onda é igual a soma das absorvâncias dos componentes individuais presentes na solução.

Sendo $A = \epsilon bc$, têm-se:

$$A_{\text{TOTAL}(\lambda)} = \epsilon_1 bc_1 + \epsilon_2 bc_2 + \dots + \epsilon_n bc_n$$

Onde, A =absorvância, ϵ =absortividade molar, b =caminho óptico e c =concentração (SKOOG, 2002).

Para determinação de ácido kójico e hidroquinona via princípio da aditividade espectrofotométrica, além das curvas analíticas já obtidas (AK em 494 nm e HQ 510 nm), construiu-se a curva analítica para o AK (Figura 22 A) em 510 nm e para HQ em 494 nm (Figura 22 B), obtendo-se o seguinte sistema de equações:

$$A_{(494 \text{ nm})} = A_{(\text{HQ } 494 \text{ nm})} + A_{(\text{AK } 494 \text{ nm})}$$

$$A_{(510 \text{ nm})} = A_{(\text{HQ } 510 \text{ nm})} + A_{(\text{AK } 510 \text{ nm})}$$

Ou:

$$A_{(494 \text{ nm})} = \epsilon_{\text{HQ}494} \cdot C_{\text{HQ}} + \epsilon_{\text{AK}494} \cdot C_{\text{AK}} = 20398,5 \cdot C_{\text{HQ}} + 1206,1 \cdot C_{\text{AK}}$$

$$A_{(510 \text{ nm})} = \epsilon_{\text{HQ}510} \cdot C_{\text{HQ}} + \epsilon_{\text{AK}510} \cdot C_{\text{AK}} = 21906,6 \cdot C_{\text{HQ}} + 1140,7 \cdot C_{\text{AK}}$$

Sendo ϵ o coeficiente angular de cada uma das retas obtidas.

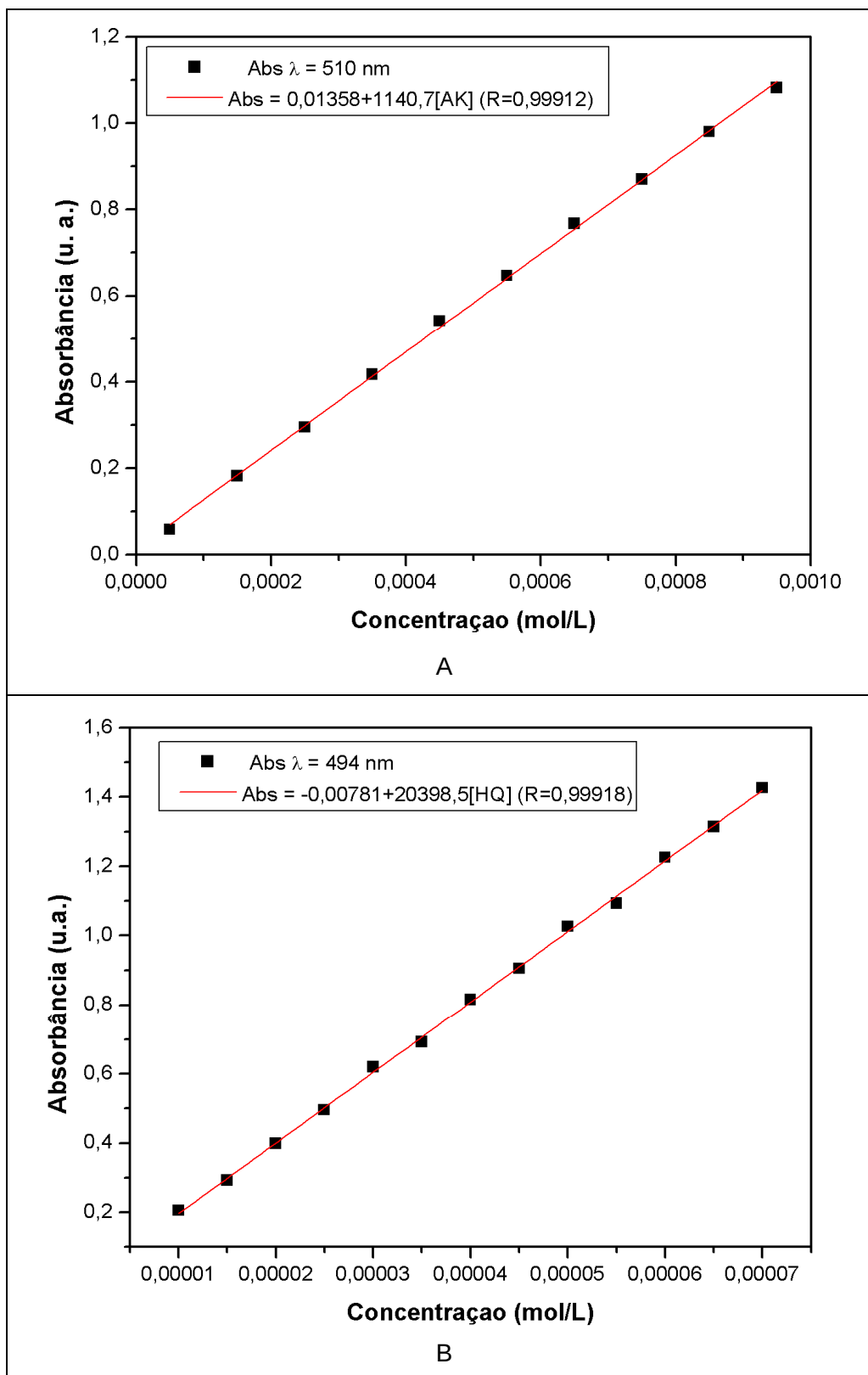


Figura 22: Curva analítica (absorbância x concentração) para determinação de AK em 510 nm (A) e HQ em 494 nm (B)

Os resultados utilizando a metodologia são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados obtidos via princípio da aditividade espectrofotométrica para determinação de AK e HQ nas misturas do conjunto de validação externa

Valor Real (mol L ⁻¹)		Valor Previsto (mol L ⁻¹)		Erro Absoluto (mol L ⁻¹)		Erro Relativo (%)		RMSEP (mol L ⁻¹)	
HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK
6,70E-05	5,50E-05	3,37E-05	1,11E-04	-3,33E-05	5,60E-05	-49,7	102	1,11E-09	3,14E-09
6,70E-05	5,50E-05	3,32E-05	1,13E-04	-3,38E-05	5,80E-05	-50,4	105	1,14E-09	3,36E-09
6,70E-05	5,50E-05	3,42E-05	1,03E-04	-3,28E-05	4,80E-05	-49,0	87,3	1,08E-09	2,30E-09
1,25E-05	9,00E-05	7,70E-06	1,16E-04	-4,80E-06	2,60E-05	-38,4	28,9	2,30E-11	6,76E-10
1,25E-05	9,00E-05	8,09E-06	1,16E-04	-4,41E-06	2,61E-05	-35,3	29,0	1,95E-11	6,82E-10
1,25E-05	9,00E-05	8,08E-06	1,04E-04	-4,42E-06	1,37E-05	-35,4	15,2	1,95E-11	1,88E-10
3,75E-05	2,40E-04	2,31E-05	3,02E-04	-1,44E-05	6,24E-05	-38,5	26,0	2,08E-10	3,90E-09
3,75E-05	2,40E-04	2,26E-05	3,06E-04	-1,49E-05	6,63E-05	-39,8	27,6	2,23E-10	4,40E-09
3,75E-05	2,40E-04	2,28E-05	3,08E-04	-1,47E-05	6,81E-05	-39,1	28,4	2,15E-10	4,64E-09
4,75E-05	1,90E-04	2,69E-05	2,46E-04	-2,06E-05	5,65E-05	-43,3	29,7	4,23E-10	3,19E-09
6,90E-05	9,75E-05	3,59E-05	1,54E-04	-3,31E-05	5,70E-05	-47,9	58,5	1,09E-09	3,25E-09
3,90E-05	8,50E-05	2,39E-05	1,25E-04	-1,51E-05	4,04E-05	-38,8	47,5	2,29E-10	1,63E-09
1,75E-05	1,40E-04	1,17E-05	1,78E-04	-5,81E-06	3,79E-05	-33,2	27,0	3,37E-11	1,43E-09
Médio						41,4	47,1	2,11E-05	5,02E-05

Como podemos observar nos resultados mostrados na Tabela 16, os erros relativos na quantificação de ambos os analitos continuam elevados (até 105% para o ácido kójico e 50,4% para a hidroquinona), indicando que essa não seria a metodologia mais adequada para determinação simultânea desses analitos, devido a ineficiência deste procedimento em circunstâncias de interferência espectral tão severa quanto a envolvida neste estudo.

Uma maior exatidão em uma análise desse tipo é atingida quando os máximos de absorção dos dois analitos não se sobrepõem consideravelmente, de modo que a substância 1, absorva fortemente no λ_1 e fracamente no λ_2 , e a outra vice-e-versa (SKOOG, 2002). Como foi possível observar na figura 21, os máximos de absorção do ácido kójico e da hidroquinona se sobrepõem consideravelmente, o que explica os erros elevados obtidos na determinação dos compostos por essa metodologia.

5.3.3 Primeira derivada dos dados espectrais

Na primeira derivada é feita a derivação de primeira ordem dos espectros UV-Vis de cada analito, para a determinação do λ onde ocorre a derivada da absorbância igual a zero (ponto de anulação). No ponto em que a derivada da absorbância de um analito é igual a zero, constrói-se a curva analítica da outra espécie de interesse e quantifica-a utilizando a equação da reta que relaciona a derivada da absorbância com a sua concentração (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Os espectros derivados de primeira ordem do ácido kójico são apresentados na Figura 23. É possível observar que um ponto de anulação não muito definido ocorre em $\lambda \approx 495$ nm, comprimento de onda em que foi construída a curva analítica para determinação de hidroquinona.

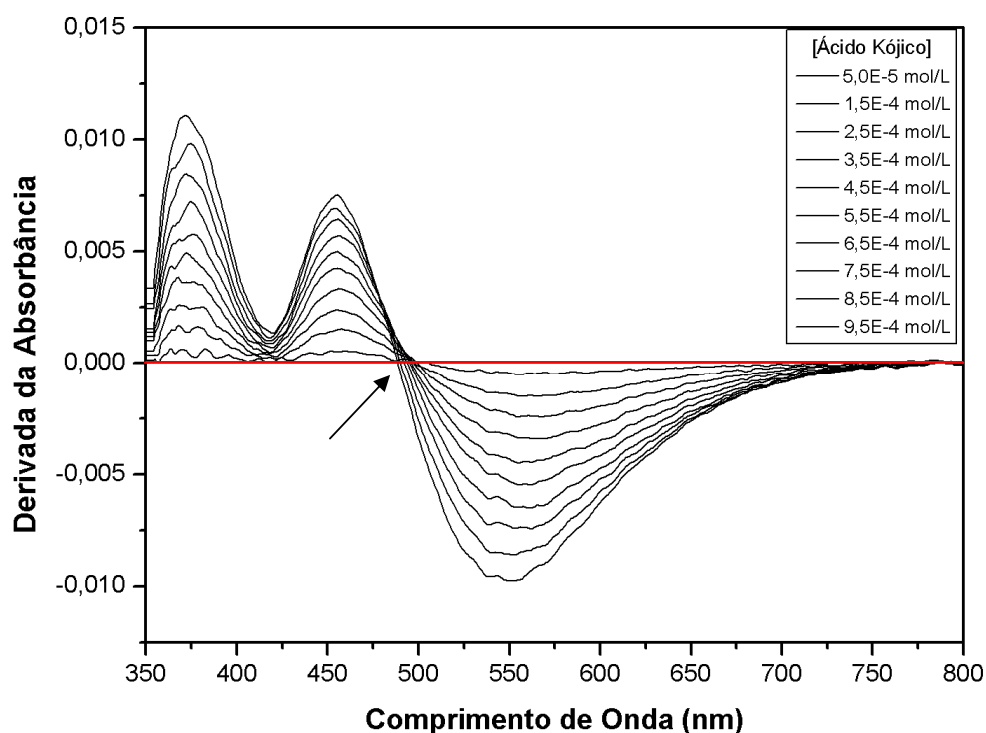


Figura 23: Primeira derivada dos espectros na região do visível de ácido kójico

A curva analítica para determinação de hidroquinona construída no ponto de anulação do ácido kójico ($\lambda=495$ nm), ou seja, no comprimento de onda em que a derivada da absorbância do ácido kójico é próxima de zero, é mostrada na Figura 24, onde é possível observar uma relação linear entre a derivada da absorbância neste comprimento de onda com a concentração de HQ.

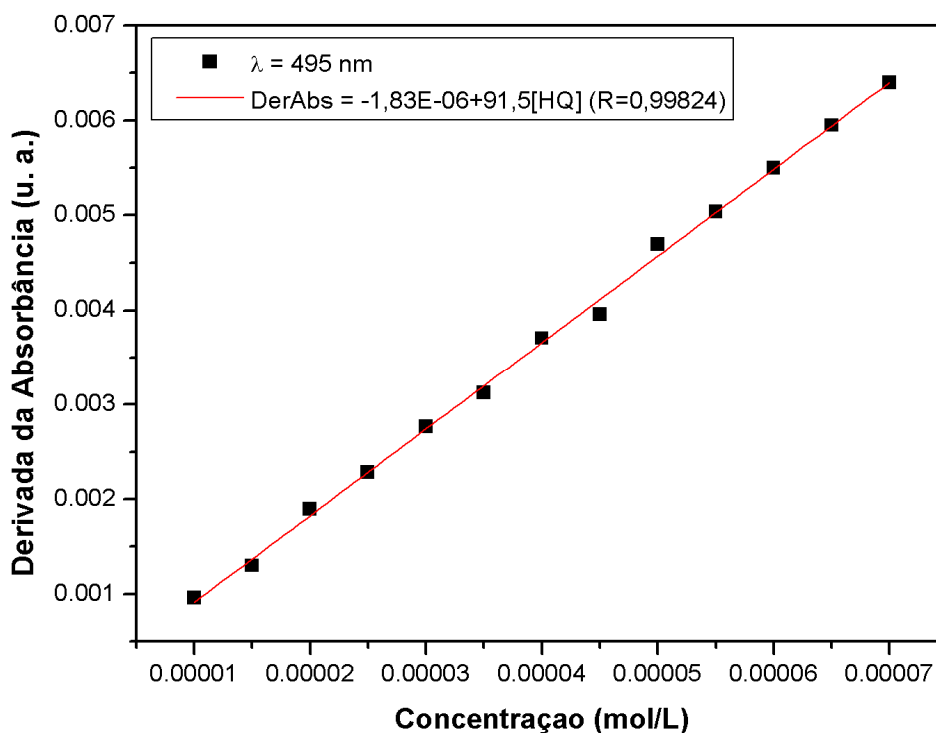


Figura 24: Curva analítica derivada para determinação de hidroquinona (da/d λ x concentração HQ)

Com a equação da reta: $dAbs = -1,83E-06 + 91,5 [HQ]$ pode-se determinar a concentração de hidroquinona nas misturas do conjunto de validação, obtendo-se um RMSEP de $2,48E-05 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados obtidos via primeira derivada para determinação de HQ (498 nm) nas misturas do conjunto de validação externa

Valor Real (mol L ⁻¹)	Valor Previsto (mol L ⁻¹)	Erro Absoluto (mol L ⁻¹)	Erro Relativo (%)	RMSEP (mol L ⁻¹)
6,70E-05	3,18E-05	-3,52E-05	-52,5	1,24E-09
6,70E-05	3,10E-05	-3,60E-05	-53,7	1,30E-09
6,70E-05	3,20E-05	-3,50E-05	-52,2	1,23E-09
1,25E-05	4,83E-06	-7,67E-06	-61,4	5,88E-11
1,25E-05	4,32E-06	-8,18E-06	-65,4	6,69E-11
1,25E-05	4,97E-06	-7,53E-06	-60,2	5,67E-11
3,75E-05	1,48E-05	-2,27E-05	-60,5	5,15E-10
3,75E-05	1,41E-05	-2,34E-05	-62,4	5,48E-10
3,75E-05	1,41E-05	-2,34E-05	-62,4	5,48E-10
4,75E-05	2,09E-05	-2,66E-05	-56,0	7,08E-10
6,90E-05	3,29E-05	-3,61E-05	-52,3	1,30E-09
3,90E-05	2,11E-05	-1,79E-05	-45,9	3,20E-10
1,75E-05	6,37E-06	-1,11E-05	-63,6	1,24E-10
Médio			57,6	2,48E-05

Através dos erros relativos da determinação de hidroquinona é possível observar a presença de erro sistemático negativo, o qual possivelmente está relacionado com a difícil determinação do ponto de anulação (próximo da região de 495 nm) nos espectros derivados do ácido kójico e com a perda de sensibilidade ocasionada pela metodologia derivativa. A sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos parâmetros instrumentais e da forma de medida do sinal, como também das características do espectro de absorção. A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que usualmente verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem de derivação (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

Os espectros derivados de primeira ordem da hidroquinona são apresentados na Figura 25, o ponto de anulação ocorre em $\lambda = 510$ nm, comprimento de onda em que foi construída a curva analítica para determinação de ácido kójico.

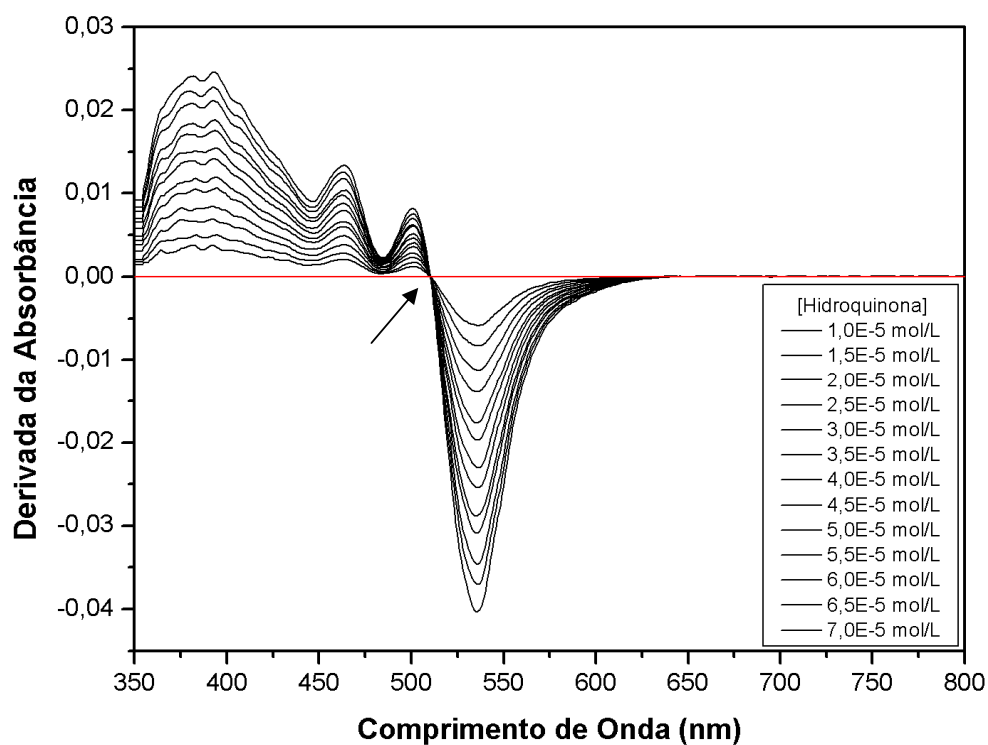


Figura 25: Primeira derivada dos espectros na região do visível de hidroquinona

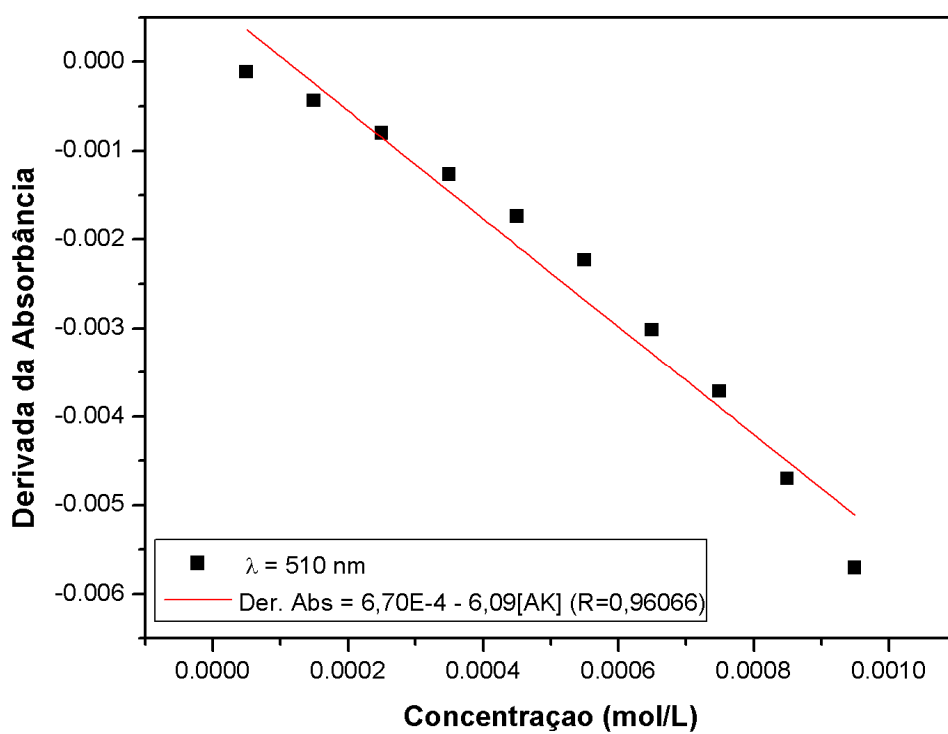


Figura 26: Curva analítica derivada para determinação de ácido kójico (da/d λ x concentração de AK)

A curva analítica para determinação de ácido kójico construída no ponto de anulaç da hidroquinona ($\lambda=510$ nm) é mostrada na Figura 26, juntamente com a equação da reta, onde é possível observar uma falta de linearidade que se traduz em um baixo coeficiente de correlação ($R=0,96066$). Esta tendência indica que para baixas e altas concentrações de AK o erro de previsão do modelo será positivo enquanto para a faixa intermediária de concentração o erro de previsão será negativo, gerando indícios da presença de um erro sistemático nesta determinação.

Empregou-se a equação da reta: $dAbs = 6,70E-04 - 6,09 [AK]$, para determinar a concentração de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação, obtendo-se um RMSEP de $1,67E-04$ mol L⁻¹. Os resultados são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18: Resultados obtidos via primeira derivada para determinação de AK (510 nm) nas misturas do conjunto de validação externa

Valor Real (mol L ⁻¹)	Valor Previsto (mol L ⁻¹)	Erro Absoluto (mol L ⁻¹)	Erro Relativo (%)	RMSEP (mol L ⁻¹)
5,50E-05	2,22E-04	1,67E-04	304	2,79E-08
5,50E-05	2,03E-04	1,48E-04	269	2,19E-08
5,50E-05	2,12E-04	1,57E-04	285	2,46E-08
9,00E-05	2,11E-04	1,21E-04	134	1,46E-08
9,00E-05	2,20E-04	1,30E-04	144	1,69E-08
9,00E-05	1,96E-04	1,06E-04	118	1,12E-08
2,40E-04	3,91E-06	-2,36E-04	98,4	5,57E-08
2,40E-04	3,91E-06	-2,36E-04	98,4	5,57E-08
2,40E-04	3,91E-06	-2,36E-04	98,4	5,57E-08
1,90E-04	3,28E-04	1,38E-04	72,6	1,90E-08
9,75E-05	2,46E-04	1,49E-04	152	2,21E-08
8,50E-05	2,28E-04	1,43E-04	168	2,04E-08
1,40E-04	2,72E-04	1,32E-04	94,3	1,74E-08
Médio			156,6	1,67E-04

Pode-se observar erros relativos menores para a determinação de HQ quando comparada a determinação de AK através da primeira derivada. Provavelmente este fato é decorrente da reta construída para HQ ter um coeficiente

de correlação maior, indicando maior linearidade entre a concentração e a derivada da absorbância e também maior coeficiente angular, indicando que a metodologia seria mais sensível para sua determinação.

Comparando-se as metodologias convencionais de calibração é possível observar que melhores resultados foram obtidos na determinação dos analitos aplicando a curva analítica para a hidroquinona (RMSEP de $1,52\text{E-}05$) e o princípio da aditividade espectrofotométrica para o ácido kójico (RMSEP de $5,02\text{E-}05$) ao invés da primeira derivada (RMSEP de $2,48\text{E-}05$ para HQ e $1,67\text{E-}04$ para AK). Isso ocorreu, provavelmente, pela dificuldade na determinação dos pontos de anulação na primeira derivada, sendo agravado pela sua proximidade (495 nm para AK e 510 nm para HQ), o que acarreta em uma diminuição ainda maior da sensibilidade da metodologia.

5.3.4 Calibração multivariada

Os espectros na região do visível do conjunto de calibração, composto por 25 espectros UV-Vis (conforme as concentrações do planejamento experimental ilustrado na figura 11), são apresentados na Figura 27. O desenvolvimento dos modelos multivariados foi realizado empregando-se a metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e procedimento de validação interna cruzada, particularmente a rotina denominada *Leave one out*, para auxiliar na escolha dos melhores modelos construídos. Neste procedimento, a calibração é realizada n vezes (n = número de amostras) sendo que em cada oportunidade uma das amostras do conjunto de calibração é retirada e utilizada como amostra de previsão. Uma vez que todas as amostras tenham sido tratadas como objeto de previsão, é possível estimar a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV) e a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (RMSEC). Dentre os vários modelos construídos evidenciou-se a otimização de um modelo para cada determinação de interesse apresentava as melhores capacidades de previsão.

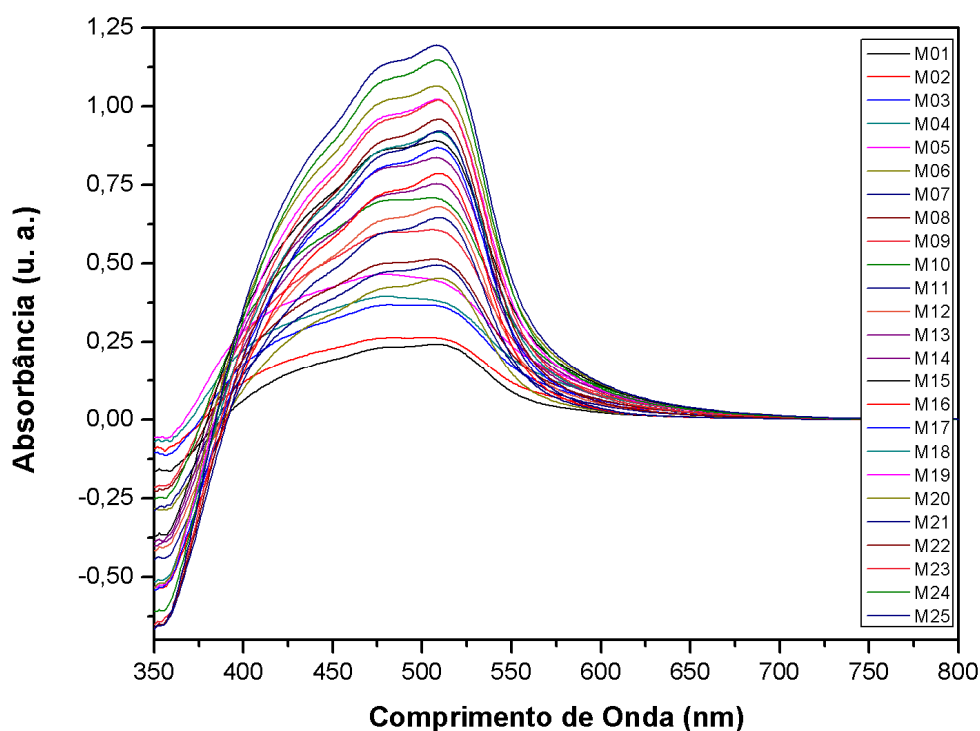


Figura 27: Espectros de absorção na região visível das misturas de ácido kójico e hidroquinona do conjunto de calibração, utilizados no desenvolvimento dos modelos multivariados

5.3.5 Modelo multivariado para determinação de ácido kójico

Para elaboração do modelo multivariado para determinação de ácido kójico, o conjunto de espectros de absorção na região do visível, foi correlacionado com a respectiva concentração de ácido kójico. Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados, alguns procedimentos de transformação e pré-processamento de dados foram testados, sendo estes: primeira derivada com alisamento e/ou dados centrados na média. Vários modelos foram construídos e os resultados resumidamente são apresentados na figura 28.

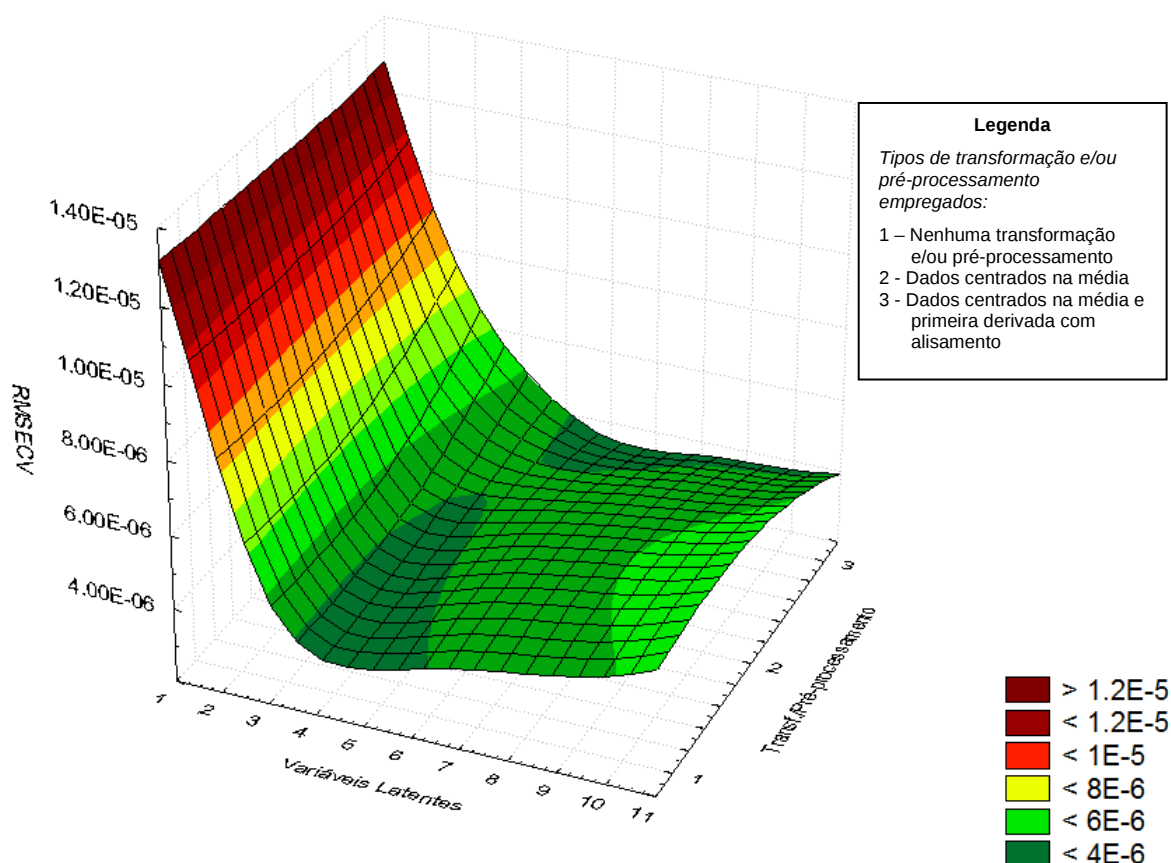


Figura 28: Representação da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV) de ácido kójico em função do processamento e do número de variáveis latentes

A partir da figura 28, observou-se que a utilização de um número inferior que 3 VLs gera altos valores de erro para qualquer uma das Transformações/Pré-processamento. Para as Transformações/Pré-processamento 1 e 2 os menores valores de erro são obtidos utilizando 3 e 4 VLs, enquanto para a Transformações/Pré-processamento 3 os menores erros são obtidos com um número maior de VLs. Optou-se então, por centrar os dados na média e utilizar 03 VLs, pois a escolha de apenas 02 VLs gera erros significativamente maiores enquanto que a inclusão de mais variáveis latentes não apresenta nenhum ganho significativo em termos de minimização dos erros. Além disso, a escolha de um maior número de variáveis latentes pode gerar modelos superestimados e pouco robustos, o que faz com que pequenas variações de tipo instrumental ou a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração, possam provocar significativa perda na capacidade de previsão.

Em função de todas estas observações, o modelo para determinação de ácido kójico com melhor capacidade de previsão apresentou as seguintes características: faixa espectral de 350 a 800 nm, com os dados centrados na média, e utilização de 03 variáveis latentes. O RMSECV e RMSEC para o modelo empregando três variáveis latentes foram de $3,45\text{E-}06 \text{ mol L}^{-1}$ e $2,72\text{E-}06 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Sendo que a variância capturada para a matriz X é 99,99% e matriz Y 99,85%.

A análise dos coeficientes de regressão (Figura 29) a partir da decomposição da matriz em 03 variáveis latentes mostra as regiões espectrais que foram consideradas relevantes para a correlação desejada. É possível observar regiões com valores de coeficiente de regressão maiores que estão relacionadas com os sinais espectrofotométricos das espécies de interesse, por exemplo, em torno de 400 nm há uma leve banda de absorção do complexo formado com o ácido kójico e em 520 nm há absorção de ambos os complexos formados para a determinação da hidroquinona e ácido kójico.

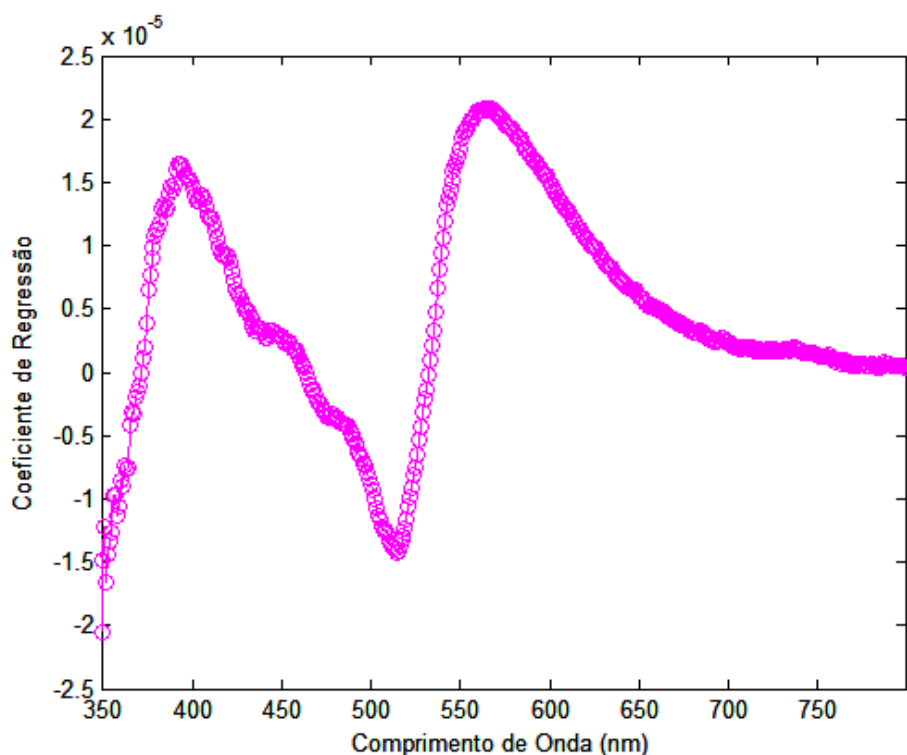


Figura 29: Gráfico do coeficiente de regressão vs. comprimento de onda do modelo para AK

O gráfico de *loadings* apresentado na Figura 30 mostra a contribuição de cada variável original na elaboração das três primeiras variáveis latentes. É possível observar que existem informações analíticas importantes nas VLs incluídas no modelo para AK.

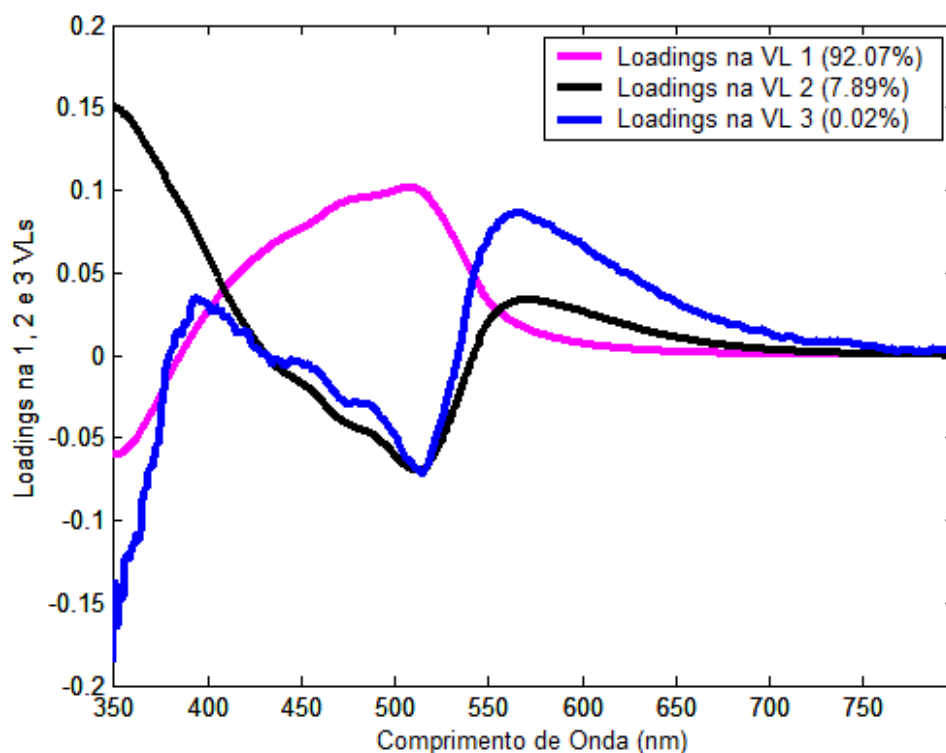


Figura 30: Gráfico de *loadings* das três primeiras variáveis latentes vs. comprimento de onda do modelo para AK

A análise do gráfico de “Resíduos de Student vs. *Leverage*” (Figura 31) mostra que a amostra 02 (em destaque) possui um alto resíduo, considerando-se um limite de confiança de 95% ($\pm 2,5$), porém não apresenta alta *leverage* (limite da *leverage* é 0,36) considerando-se o modelo construído com 03 variáveis latentes. Testou-se a retirada da amostra 02 do modelo de ácido kójico, porém a capacidade de previsão não melhorou significativamente, dando indícios de que a amostra 02 não é uma amostra anômala.

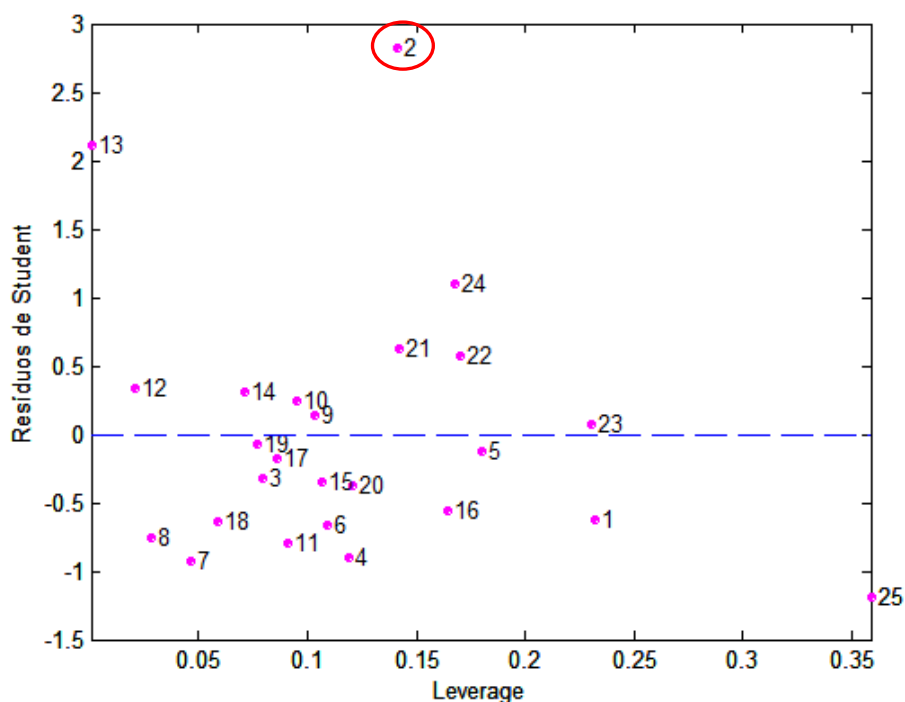


Figura 31: Gráfico dos Resíduos de Student vs. Leverage do modelo para AK

A Figura 32 ilustra o gráfico dos valores reais vs. os valores previstos pelo modelo de regressão durante a validação interna cruzada, como é possível observar o modelo apresentou boa capacidade preditiva, já que o valor previsto pelo modelo é muito próximo ao valor real de concentração do ácido kójico.

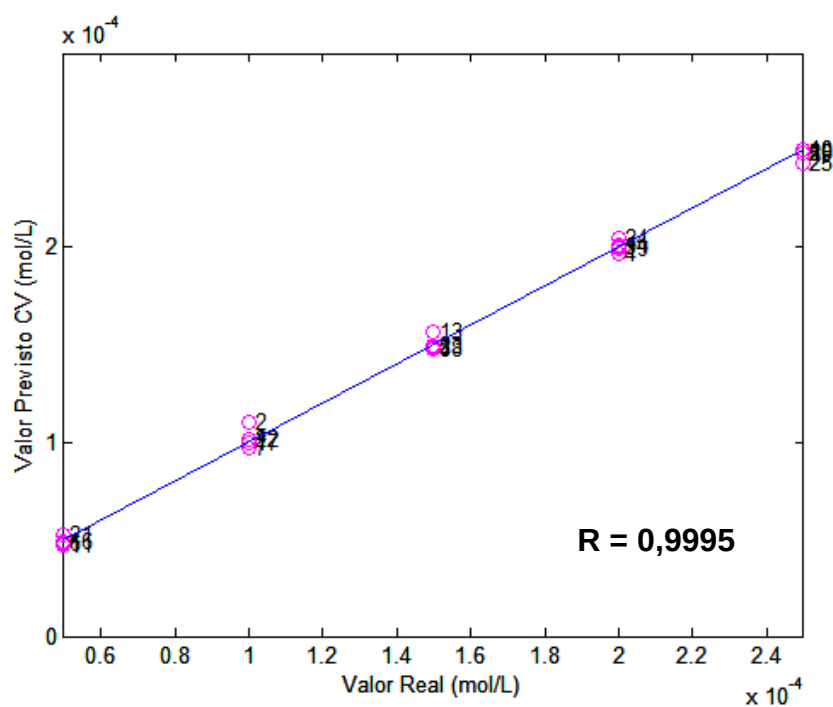


Figura 32: Valor Previsto (CV) vs. Valor Real do modelo para AK

A capacidade de previsão do modelo também foi analisada por um conjunto de validação externa, utilizando-se os valores de RMSEP. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados obtidos para o modelo PLSR para determinação de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação externa

Valor Real (mol L ⁻¹)	Valor Previsto (mol L ⁻¹)	Erro Absoluto (mol L ⁻¹)	Erro Relativo (%)	RMSEP (mol L ⁻¹)
5,50E-05	5,87E-05	3,70E-06	6,73	1,37E-11
5,50E-05	5,84E-05	3,40E-06	6,18	1,16E-11
5,50E-05	5,12E-05	-3,80E-06	-6,91	1,44E-11
9,00E-05	8,35E-05	-6,50E-06	-7,22	4,23E-11
9,00E-05	8,57E-05	-4,30E-06	-4,78	1,85E-11
9,00E-05	8,13E-05	-8,70E-06	-9,67	7,57E-11
2,40E-04	2,36E-04	-4,00E-06	-1,67	1,60E-11
2,40E-04	2,38E-04	-2,00E-06	-0,83	4,00E-12
2,40E-04	2,39E-04	-1,00E-06	-0,42	1,00E-12
1,90E-04	1,87E-04	-3,00E-06	-1,58	9,00E-12
9,75E-05	1,00E-04	2,50E-06	2,56	6,25E-12
8,50E-05	8,59E-05	9,00E-07	1,06	8,10E-13
1,40E-04	1,33E-04	-7,00E-06	-5,00	4,90E-11
Médio			4,20	4,49E-06

Os erros relativos observados na determinação de ácido kójico nas misturas sintéticas do conjunto de validação através do modelo multivariado foram baixos, inferiores a 9,7%, com erro relativo médio de 4,20%.

5.3.6 Modelo multivariado para determinação de Hidroquinona

No caso da hidroquinona, o conjunto de calibração, foi correlacionado com a respectiva concentração de hidroquinona. Para melhorar a eficiência dos modelos multivariados, alguns procedimentos de transformação e pré-processamento de

dados foram testados, sendo estes: primeira derivada com alisamento e dados centrados na média. Vários modelos foram construídos e os resultados resumidamente são apresentados na figura 33.

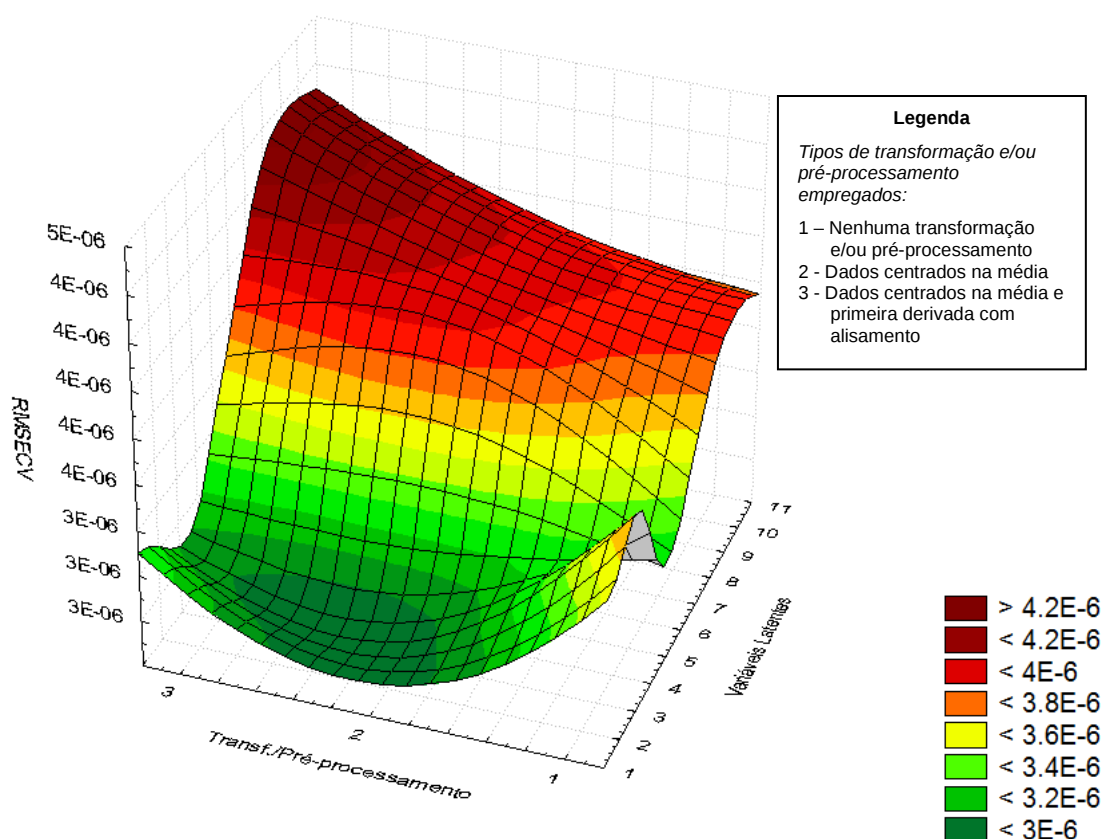


Figura 33: Representação da Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV) de hidroquinona em função do processamento e do número de variáveis latentes

Nesta figura observou-se que os menores valores de erro são obtidos com a utilização da Transformação/Pré-processamento 2 (dados centrados na média) e um número pequeno de VLs. Optou-se por 02 VLs, pois com a escolha de mais variáveis latentes não se observou ganho significativo em termos de minimização dos erros que justificasse essa inclusão.

Assim, o modelo para determinação de hidroquinona com melhor capacidade de previsão apresentou as seguintes características: faixa espectral de 350 a 800 nm, com os dados centrados na média, e utilização de 02 variáveis latentes. O RMSECV e RMSEC para o modelo empregando duas variáveis latentes foram de

2,93E-06 e 2,53E-06, respectivamente. Sendo que a variância capturada para a matriz X é 99,96% e matriz Y 98,57%.

A análise dos coeficientes de regressão (Figura 34) a partir da decomposição da matriz em 02 variáveis latentes mostra as regiões espectrais que foram consideradas relevantes para a correlação desejada. É possível observar regiões com valores de coeficiente de regressão maiores, por exemplo, por volta de 510 nm, que está relacionada com o sinal espectrofotométrico do complexo formado para a determinação indireta da hidroquinona e pode ser considerada uma região de extrema importância para determinação do analito.

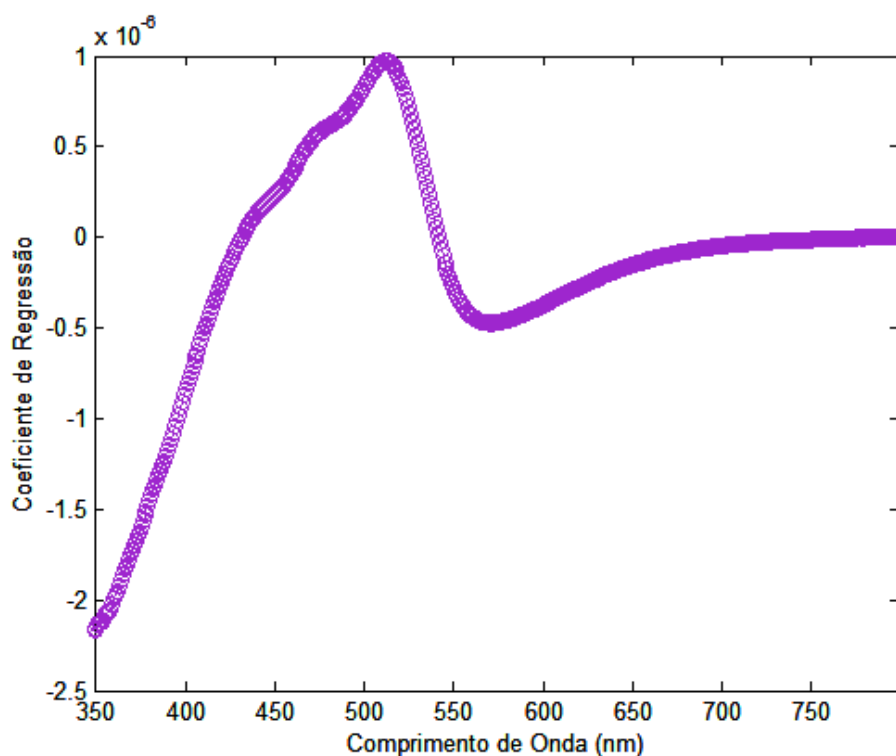


Figura 34: Gráfico do coeficiente de regressão vs. comprimento de onda do modelo para HQ

Já a Figura 35 contém o gráfico dos *loadings*, no qual é possível observar que existem informações analíticas importantes nas duas VLs incluídas no modelo.

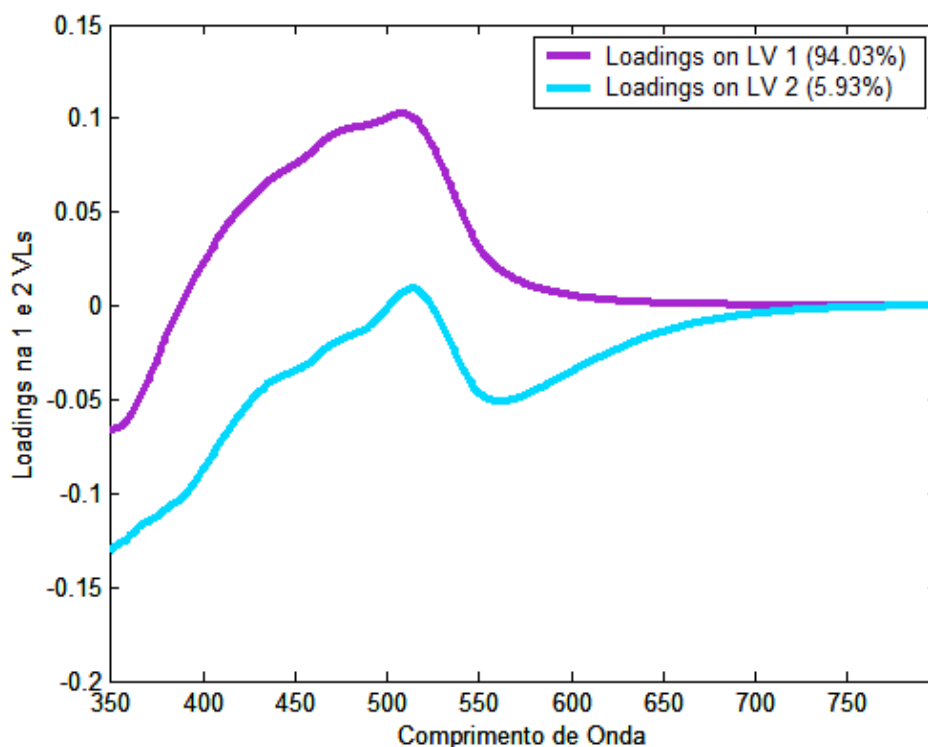


Figura 35: Gráfico de *loadings* das duas primeiras variáveis latentes vs. comprimento de onda do modelo para HQ

No caso da hidroquinona, outra característica importante foi a ausência de amostras anômalas no conjunto de calibração. Os limites da *leverage*, considerando-se 02 variáveis latentes foi de 0,24. Analisando o gráfico “Resíduos de Student vs. *Leverage*” (Figura 36), é possível observar que não há amostras com alto resíduo, considerando um resíduo de $\pm 2,5$ com 95% de confiança e/ou alta *leverage*, sendo assim não há evidências de amostras anômalas no modelo.

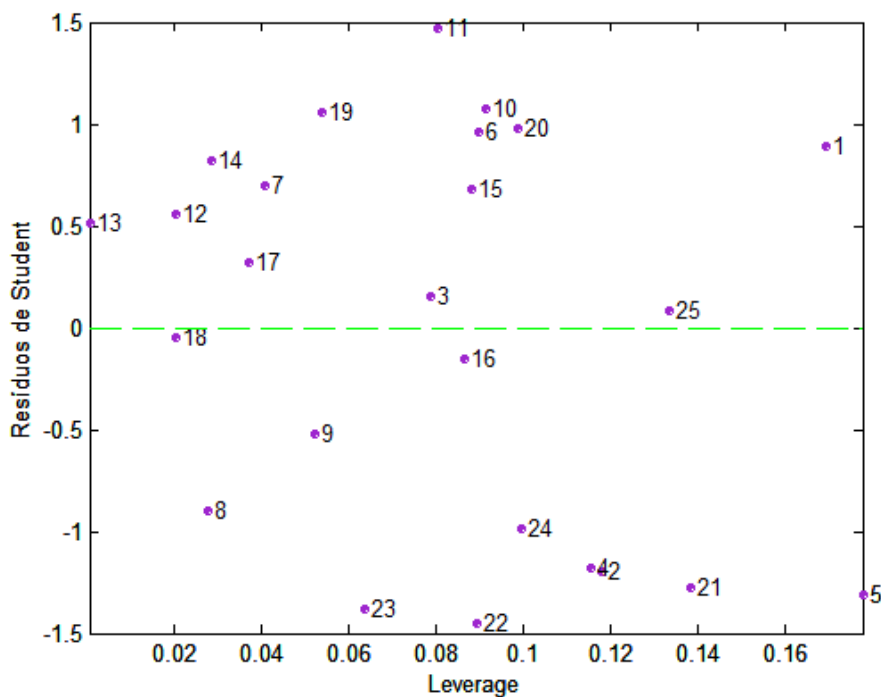


Figura 36: Gráfico dos Resíduos de Student vs. Leverage do modelo para HQ

A Figura 37 ilustra o gráfico dos valores reais vs. os valores previstos pelo modelo de regressão durante a validação interna, como é possível observar o modelo apresentou boa capacidade preditiva, já que o valor previsto pelo modelo é muito próximo ao valor real de concentração de hidroquinona.

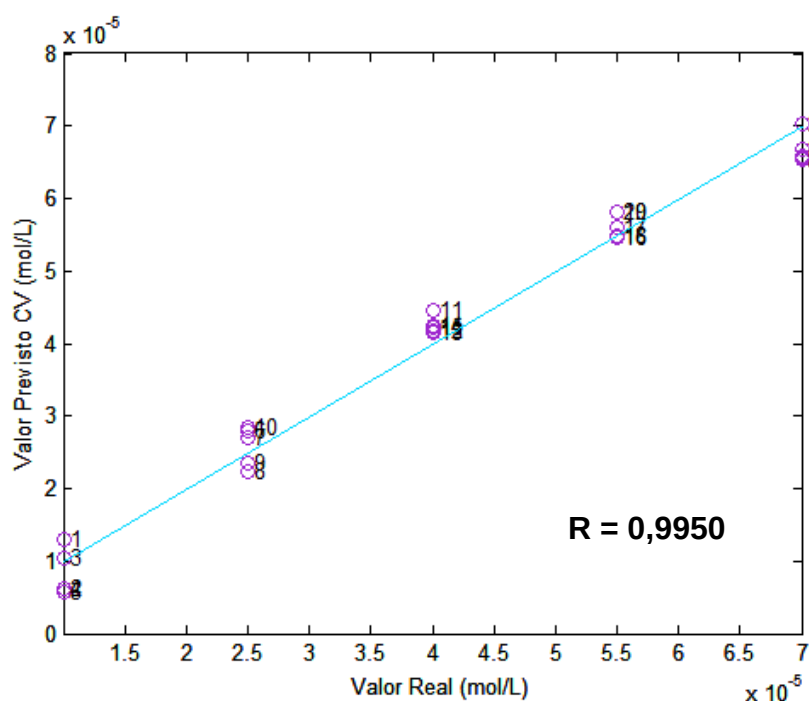


Figura 37: Valor Previsto (CV) vs. Valor Real do modelo para HQ

A capacidade de previsão do modelo da hidroquinona, também foi analisada por um conjunto de validação externa, utilizando-se os valores de RMSEP. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Resultados obtidos para o modelo PLSR para determinação de hidroquinona nas misturas do conjunto de validação externa

Valor Real (mol L ⁻¹)	Valor Previsto (mol L ⁻¹)	Erro Absoluto (mol L ⁻¹)	Erro Relativo (%)	RMSEP (mol L ⁻¹)
6,70E-05	6,12E-05	-5,80E-06	-8,66	3,36E-11
6,70E-05	6,15E-05	-5,50E-06	-8,21	3,03E-11
6,70E-05	6,36E-05	-3,40E-06	-5,07	1,16E-11
1,25E-05	1,26E-05	1,00E-07	0,8	1,00E-14
1,25E-05	1,19E-05	-6,00E-07	-4,80	3,60E-13
1,25E-05	1,34E-05	9,00E-07	7,20	8,10E-13
3,75E-05	4,07E-05	3,20E-06	8,53	1,02E-11
3,75E-05	4,06E-05	3,10E-06	8,27	9,61E-12
3,75E-05	4,16E-05	4,10E-06	10,9	1,68E-11
4,75E-05	4,81E-05	6,00E-07	1,26	3,60E-13
6,90E-05	6,46E-05	-4,40E-06	-6,38	1,94E-11
3,90E-05	4,10E-05	2,00E-06	5,13	4,00E-12
1,75E-05	1,81E-05	6,00E-07	3,43	3,60E-13
Médio			6,05	3,25E-06

Os erros relativos para determinação de hidroquinona nas misturas sintéticas do conjunto de validação externa através do modelo multivariado foram inferiores a 11%, com erro relativo médio de 6,05%, resultados que podem ser considerados satisfatórios.

Analisando os valores de RMSEP e erro relativo obtidos na determinação de hidroquinona e de ácido kójico nas misturas do conjunto de validação externa pelos métodos convencionais e multivariados (Tabela 21), é possível observar uma melhora significativa na capacidade de previsão, quando se utiliza o modelo multivariado, em relação aos modelos convencionais.

Tabela 21: Comparação das metodologias convencionais e multivariadas para determinação de AK e HQ nas misturas do conjunto de validação externa utilizando-se RMSEP (mol L^{-1}) e erro relativo médio

	AK		HQ	
	RMSEP	E _R (%)	RMSEP	E _R (%)
Curva analítica	4,63E-04	470	1,52E-05	20,6
Método de Vierordt	5,02E-05	47,1	2,11E-05	41,4
Primeira Derivada	1,67E-04	156,6	2,48E-05	57,6
PLSR	4,49 E-06	4,20	3,25 E-06	6,05

A utilização da espectrofotometria na região do visível acoplada ao PLSR mostrou-se satisfatória para determinação da associação dermocosmética de ácido kójico e hidroquinona em misturas sintéticas, por se tratar de uma técnica simples, de baixo custo, alta sensibilidade e por apresentar baixos erros relativos médios.

5.4 RESULTADOS DOS ESTUDOS DE VALIDAÇÃO

Estudos de validação foram realizados, de acordo com critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio de sua resolução nº99/03 (ANVISA, 2003). Os indicadores avaliados foram a especificidade, a linearidade, o intervalo, a precisão, a exatidão e a robustez. Para realização deste estudo, os modelos multivariados de melhor desempenho foram selecionados, os quais empregaram faixa espectral de 350 a 800 nm, dados centrados na média, 03 e 02 variáveis latentes para AK e HQ, respectivamente.

5.4.1 Especificidade

A especificidade do modelo multivariado sob validação foi avaliada por ensaio de recuperação, em que quantidades conhecidas de ácido kójico e hidroquinona padrão foram adicionadas ao veículo (base gel) e posteriormente determinadas.

Os resultados obtidos para o ensaio de recuperação são apresentados na

Tabela 22.

Tabela 22: Resultados do ensaio de recuperação para determinação da especificidade

	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03	
	AK (2%)	HQ (2%)	AK (2%)	HQ (1%)	AK (4%)	HQ (1%)
Valor Previsto (mol L⁻¹)	1,18E-03	1,29 E-03	1,14E-03	7,39E-04	2,29E-03	7,11E-04
	1,19E-03	1,46 E-03	1,12E-03	7,06E-04	2,15E-03	7,85E-04
	1,25E-03	1,31 E-03	1,16E-03	7,15E-04	2,20E-03	6,76E-04
Média (mol L⁻¹)	1,21E-03	1,35E-03	1,14E-03	7,20E-04	2,21E-03	7,24E-4
Valor Real (mol L⁻¹)	1,13E-03	1,45E-03	1,12E-03	7,32E-04	2,25E-03	7,33E-04
Recuperação	107,08%	93,10%	101,78%	98,36%	98,37%	98,77%

Avaliando os resultados, observou-se que o método multivariado proposto para determinação dos analitos mostrou especificidade em relação à matriz, com boas porcentagens de recuperação, próximas a 100%.

5.4.2 Linearidade e Intervalo

A avaliação da linearidade em um modelo multivariado (PLSR ou PCR) é problemática, já que as variáveis são decompostas pelas variáveis latentes. Assim, uma medida quantitativa para este parâmetro não corresponde a uma tarefa simples. Qualitativamente, o gráfico dos resíduos pode indicar se os dados seguem um comportamento linear, se a distribuição desses resíduos for aleatória (VALDERRAMA *et. al.*, 2009). Neste trabalho, além de avaliar o gráfico dos resíduos foi observado os gráficos dos valores reais de concentração das amostras em função dos valores previstos pelo modelo durante a validação cruzada (Figuras 32 e 37). Os coeficientes de correlação obtidos a partir destas retas foram altos: 0,9995 para o ácido kójico e 0,9950 para a hidroquinona.

Os dados de coeficientes de correlação juntamente com a aleatoriedade dos resíduos obtidos apresentados na Figura 38, indicam um bom ajuste do modelo multivariado, sendo este linear na faixa de concentração estudada, ou seja, 5,0E-05 a 2,5E-04 mol L⁻¹ para o ácido kójico e 1,0E-05 a 7,0E-05 mol L⁻¹ para hidroquinona.

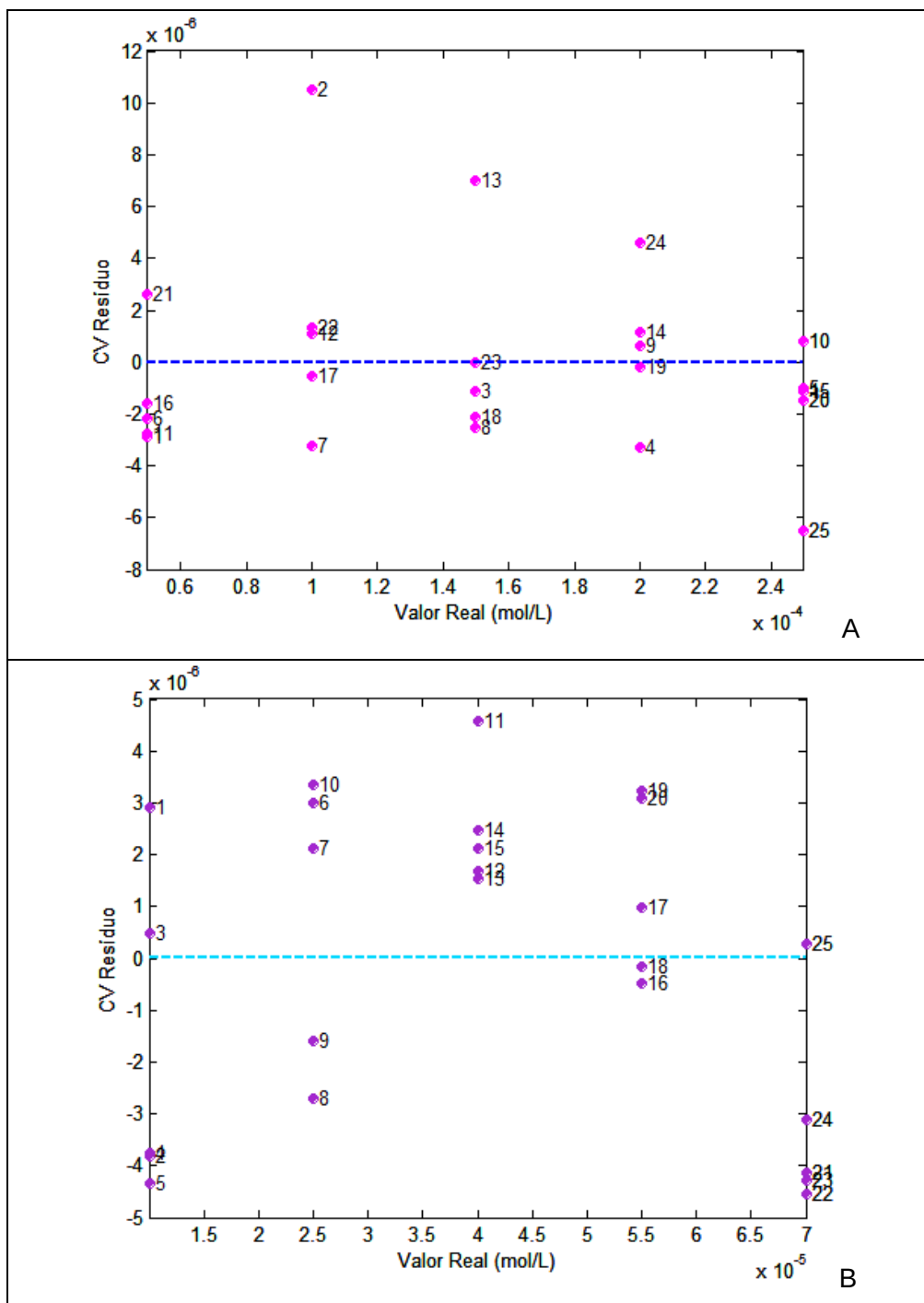


Figura 38: Gráfico do Resíduo x Valor Real (mol L^{-1}) para o ácido kójico (A) e para hidroquinona (B)

5.4.3 Precisão

As análises de precisão envolveram estudos de repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). A reprodutibilidade do

método não foi analisada tendo em vista a não disponibilidade da realização de medidas inter-laboratoriais. Neste trabalho, esta figura de mérito analítico foi obtida através dos cálculos de coeficiente de variação (que foram comparados aos valores referenciados pela ANVISA) e também através de um valor médio de precisão para cada um dos analitos, conforme equação abaixo (BRAGA e POPPI, 2004).

$$\text{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{y}_{ij} - \hat{\bar{y}}_i)^2}{n(m-1)}}$$

onde m é o número de replicatas feitas, n o número de amostras, $\hat{\bar{y}}_i$ é a média dos valores previstos de cada replicata $\hat{y}_{ij}$.

Os resultados do ensaio de repetibilidade mostrados na Tabela 23 apontam dois coeficientes de variação pouco acima da máxima de 5% permitida pela ANVISA (2003) para este teste. O limite foi ultrapassado para as amostras que contemplam as menores concentrações analisadas dos analitos, ou seja, nas amostras 01 e 02 para o ácido kójico a hidroquinona, respectivamente. A repetibilidade (mol L^{-1}) alcançada pela metodologia para determinação de AK e HQ foi de $2,91\text{E-}06$ e $9,27\text{E-}07$, respectivamente.

Tabela 23: Resultados do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrída)

	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03	
	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
Concentração (mol/L)	5,50E-05	6,70E-05	9,00E-05	1,25E-05	2,40E-04	3,75E-05
Previsto	5,87E-05	6,12E-05	8,35E-05	1,26E-05	2,36E-04	4,07E-05
	5,84E-05	6,15E-05	8,57E-05	1,19E-05	2,38E-04	4,06E-05
	5,12E-05	6,36E-05	8,13E-05	1,34E-05	2,39E-04	4,16E-05
Média	5,61E-05	6,21E-05	8,35E-05	1,26E-05	2,38E-04	4,10E-05
DP	4,25E-06	1,31E-06	2,20E-06	7,51E-07	1,53E-06	5,51E-07
CV (%)	7,57	2,11	2,63	5,94	0,64	1,34

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 24.

Tabela 24: Resultados do ensaio de precisão intermediária (precisão inter-corrida)

	Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03	
	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
Concentração (mol/L)	5,50E-05	6,70E-05	9,00E-05	1,25E-05	2,40E-04	3,75E-05
Analista 01	5,87E-05	6,12E-05	8,35E-05	1,26E-05	2,36E-04	4,07E-05
	5,84E-05	6,15E-05	8,57E-05	1,19E-05	2,38E-04	4,06E-05
	5,12E-05	6,36E-05	8,13E-05	1,34E-05	2,39E-04	4,16E-05
Analista 02	6,03E-05	6,81E-05	9,01E-05	1,34E-05	2,36E-04	4,18E-05
	6,24E-05	6,60E-05	9,19E-05	1,27E-05	2,40E-04	4,29E-05
	5,87E-05	6,65E-05	7,70E-05	1,16E-05	2,36E-04	4,17E-05
Média	5,83E-05	6,45E-05	8,49E-05	1,26E-05	2,38E-04	4,16E-05
DP	3,78E-06	2,83E-06	5,55E-06	7,46E-07	1,76E-06	8,41E-07
CV (%)	6,49%	4,38%	6,54%	5,92%	0,74%	2,02%

No ensaio de precisão intermediária, também obteve-se alguns coeficientes de variação pouco acima da máxima (5%) permitida pela ANVISA (2003), que ocorreram nas duas menores concentrações de ácido kójico e na menor concentração de hidroquinona. A precisão intermediária (mol L^{-1}) alcançada pela metodologia para determinação de AK e HQ foi de $4,50\text{E-}06$ e $1,96\text{E-}06$, respectivamente.

A análise final dos resultados dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária permite afirmar que o método espectrofotométrico multivariado para determinação de AK e HQ apresenta-se pouco preciso para as menores concentrações dos analitos, tanto para análises intra-corrida como inter-corridas. Além disso, os valores de repetibilidade e precisão intermediária mostraram que a determinação de ácido kójico foi aquela que apresentou maiores problemas de precisão.

5.4.4 Exatidão

Com os resultados das previsões para as amostras sintéticas (conjunto de validação externa), foi possível verificar a exatidão do modelo multivariado, utilizando-se a raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP) e erro relativo médio. A exatidão também foi avaliada por meio do ensaio de recuperação discutido anteriormente no item 5.4.1 especificidade.

Os valores de RMSEP e erro relativo médio, para os modelos PLSR multivariados foram: $3,25\text{E-}06 \text{ mol L}^{-1}$ e 6,05% (Tabela 20) para hidroquinona e $4,49\text{E-}06 \text{ mol L}^{-1}$ e 4,20% (Tabela 19) para o ácido kójico, esses os baixos valores juntamente com as boas taxas de recuperação (próximas a 100%) indicam que a metodologia desenvolvida para determinação dos analitos é exata.

5.4.5 Robustez

A análise da robustez determinará as condições próprias em que deve ser desenvolvida a calibração e os fatores que devem ser levados em conta durante a construção do modelo (CORRER, 2004). Neste trabalho, o único parâmetro de robustez avaliado foi a influência da temperatura.

O comportamento espectral da solução contendo a mistura de ácido kójico ($1,5 \text{ E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e hidroquinona ($4,0 \text{ E-}05 \text{ mol L}^{-1}$) foi observado em diferentes temperaturas. A solução foi lida nas temperaturas de 5 a 55°C, com intervalos de 5°C entre as medidas. Os espectros resultantes são apresentados na Figura 39 e mostram uma diminuição significativa na absorbância da mistura ($\lambda = 400 \text{ a } 550 \text{ nm}$) com o aumento da temperatura, principalmente para temperaturas acima de 35 °C. Essa diferença na absorbância indica um erro elevado na determinação de misturas, nas temperaturas a partir de 40°C.

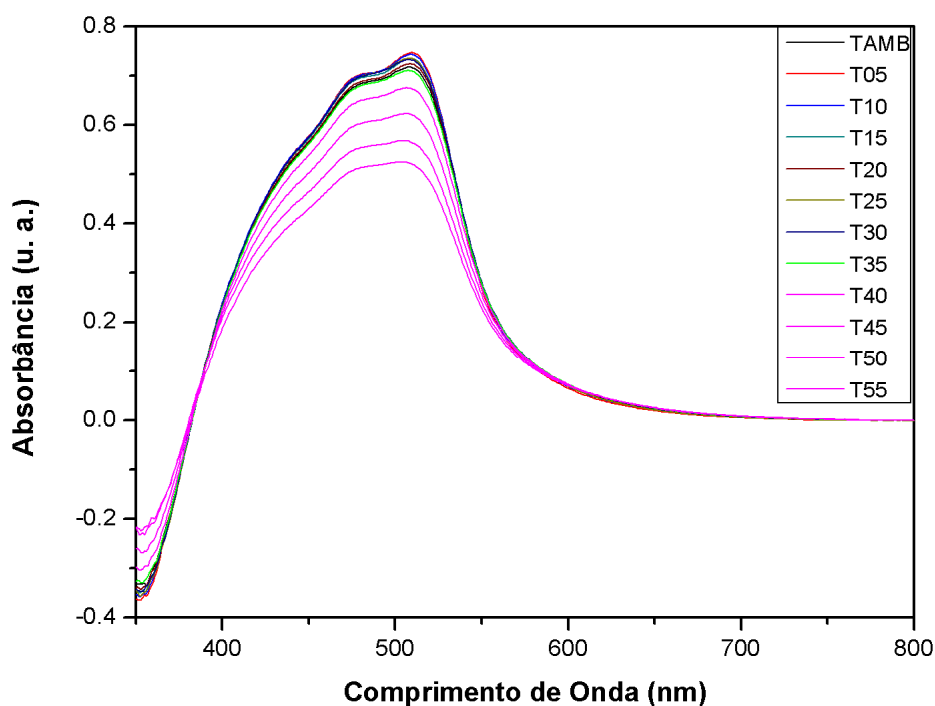


Figura 39: Espectros de absorção na região visível da mistura AK ($1,5 \text{ E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e HQ ($4,0 \text{ E-}05 \text{ mol L}^{-1}$) nas temperaturas de 5 a 55 °C na avaliação da robustez

Submeteu-se os espectros obtidos em diferentes temperaturas à determinação dos analitos pelos modelos multivariados sob análise, os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Resultados obtidos na determinação da mistura AK ($1,5 \text{ E-}04 \text{ mol L}^{-1}$) e HQ ($4,0 \text{ E-}05 \text{ mol L}^{-1}$) via PLSR em diferentes temperaturas na avaliação da robustez

Valor Real (mol L ⁻¹)		Valor Previsto (mol L ⁻¹)		Erro Relativo (%)		Temperatura (°C)
HQ	AK	HQ	AK	HQ	AK	
4,00E-05	1,50E-04	3,87E-05	1,38E-04	-3,38	-7,73	05
4,00E-05	1,50E-04	3,80E-05	1,46E-04	-4,95	-2,47	10
4,00E-05	1,50E-04	3,73E-05	1,49E-04	-6,68	-0,73	15
4,00E-05	1,50E-04	3,67E-05	1,52E-04	-8,33	1,40	20
4,00E-05	1,50E-04	3,81E-05	1,47E-04	-4,73	-2,20	25
4,00E-05	1,50E-04	3,76E-05	1,54E-04	-6,03	2,67	30
4,00E-05	1,50E-04	3,59E-05	1,56E-04	-10,2	3,67	35
4,00E-05	1,50E-04	3,33E-05	1,56E-04	-16,9	4,07	40
4,00E-05	1,50E-04	2,93E-05	1,57E-04	-26,8	4,80	45
4,00E-05	1,50E-04	2,51E-05	1,57E-04	-37,4	4,80	50
4,00E-05	1,50E-04	2,34E-05	1,52E-04	-41,6	1,20	55

Observou-se que a determinação de ácido kójico não sofre influência da temperatura, considerando-se o comportamento aleatório dos erros relativos e seus baixos valores (valores inferiores a 7,8%).

As porcentagens de erro relativo superiores a 10,2% observadas para determinação de hidroquinona e o aumento crescente deste parâmetro conforme ocorre o aumento da temperatura indicam a limitação na capacidade preditiva do método multivariado, quando a temperatura das amostras é elevada, ou seja, quando a temperatura é superior a 35°C. Este aumento no erro relativo de previsão, provavelmente está relacionado com o fato da degradação oxidativa da hidroquinona ser acelerada pelo calor (MANOSROI *et al.*, 1999). Assim, recomenda-se que a leitura das misturas contendo ácido kójico e hidroquinona seja realizada nas temperaturas entre 5 a 35 °C.

5.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

A metodologia multivariada desenvolvida foi utilizada para a determinação de ácido kójico e hidroquinona em 08 formulações obtidas em farmácias de manipulação da região, contendo diferentes concentrações dos analitos em base gel. Os resultados das análises destes dermocosméticos são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados de previsão de ácido kójico e hidroquinona em amostras reais, utilizando-se o método multivariado desenvolvido

Dermocosmético	Concentração declarada (% m/m)		Concentração Prevista (% m/m)		Erro (%)	
	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
Manipulado 1	2,00	2,00	2,74	1,94	37,0	-3,00
Manipulado 2	2,00	1,00	2,52	1,09	26,0	9,00
Manipulado 3	2,00	2,00	2,18	1,82	9,00	-9,00
Manipulado 4	2,00	2,00	2,33	2,84	16,5	42,0
Manipulado 5	2,00	2,00	2,12	1,93	6,00	-3,50
Manipulado 6	1,00	1,00	1,14	1,12	14,0	12,0
Manipulado 7	2,00	2,00	5,49	1,59	175	-20,5
Manipulado 8	2,00	1,00	5,15	0,96	158	-4,00

Observou-se nos resultados de quantificação, valores de erro relativo de até 42,0% para hidroquinona e 175,0% para o ácido kójico, sendo que neste último caso, existe uma clara tendência de superestimar as concentrações declaradas pelo fabricante.

Dois casos da Tabela 26 merecem ser destacados, pelos altos valores de erros relativos apresentados para a determinação de AK. O manipulado 7 e 8 são provenientes da mesma farmácia de manipulação, que produz suas formulações em gel Aristoflex® (co-polímero sintético de ácido sulfônico acriloldimetiltaurato e vinilpirrolidona), diferente dos demais manipulados que utilizam gel Natrosol® (Hidroxietilcelulose). Outra particularidade desses manipulados é a utilização de metabissulfito como agente conservante. O segundo caso, está relacionado ao manipulado 1 e 2, provenientes de outra farmácia de manipulação e que utiliza para estas formulações os conservantes imidazolidinil uréia e isotiazolinona. Estas características indicam que a metodologia deve ser usada com precaução, já que o tipo de base gel e os conservantes utilizados evidenciaram interferências na metodologia de quantificação.

Outro fator que não pode ser descartado em relação às variações encontradas para formulações similares (manipulado 3 e 4) é a falta de homogeneidade das amostras de dermocosméticos, já que para esta análise foi retirada uma pequena alíquota (0,3 g a 0,8 g) da amostra para diluição.

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados apresentados e discutidos neste projeto é possível concluir que:

Através do planejamento fatorial, observou-se que para concentrações de FeCl_3 acima de $7,5\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ a reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico não sofre influência do pH, podendo ser utilizados qualquer um dos pHs estudados. Com as condições já otimizadas, optou-se por utilizar a concentração $8,0\text{E-}04 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto férrico e tampão Clark Lubs em pH 3,0.

O método da variação contínua nos permitiu identificar que a estequiometria predominante do complexo AK-Fe(III) é 1:1,5, ou seja, 2 moléculas de Fe(III) para cada 3 moléculas de ácido kójico.

A severa interferência espectral observada para os complexos formados inviabilizou a determinação dos analitos utilizando-se os métodos convencionais de análise (curva analítica, princípio da aditividade espectrofotométrica e primeira derivada), resultando em erros relativos médios muito altos (maiores que 20%, para ambos clareadores).

A espectrofotometria na região do visível acoplada a técnica de calibração multivariada (PLSR), apresentou-se adequada para determinação dos analitos em misturas sintéticas, com erros relativos médios de previsão de 4,20% para o ácido kójico e 6,05% para hidroquinona. Os modelos multivariados de melhor capacidade preditiva apresentaram como características: a utilização de toda faixa espectral, dados centrados na média e a utilização de 03 e 02 variáveis latentes para o ácido kójico e a hidroquinona, respectivamente.

Na fase de validação, segundo os critérios da ANVISA, a metodologia espectrofotométrica multivariada desenvolvida, apresentou boa exatidão, especificidade em relação a matriz e linearidade na faixa de concentração estudada. No parâmetro precisão, coeficientes de variação pouco acima da máxima permitida pela legislação foram obtidos para as menores concentrações de ácido kójico e hidroquinona. A leitura de amostras em temperatura superior a 35°C tem influência direta sobre a capacidade preditiva do método desenvolvido, aumentando a margem de erro para determinação de hidroquinona.

Na análise de amostras reais, altos valores de erros relativos foram encontrados para a determinação dos analitos, especialmente para determinação de ácido kójico. Estes problemas podem estar associados a presença de interferentes (base gel ou conservantes). No entanto, é pertinente salientar que o método desenvolvido mostrou-se promissor para aplicação em rotinas de controle de qualidade, por se tratar de uma técnica rápida, de baixo custo e praticamente sem produção de resíduos de grande impacto ambiental.

7 TRABALHOS FUTUROS

A realização deste trabalho permitiu vislumbrar possibilidades para trabalhos futuros. Seguem-se algumas sugestões:

- Desenvolver modelos de calibração multivariada para determinação da associação de ácido kójico e hidroquinona em dermocosméticos empregando-se a espectrofotometria em fase sólida através de medidas de reflectância na região do visível.
- Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de ácido kójico e hidroquinona em dermocosméticos empregando-se técnicas voltamétricas associadas a métodos de calibração multivariada.
- Realizar um estudo mais aprofundado da aplicabilidade da metodologia proposta, frente a utilização de diversos tipos de conservantes nas formulações dermocosméticas.
- Desenvolver metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de diversos princípios ativos, visando a aplicação em rotinas controle de qualidade produtos farmacêuticos manipulados.

8 GLOSSÁRIO

Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis*): Método que decompõe a matriz de dados, construindo-se um novo sistema de eixos (denominados componentes principais ou variáveis latentes). Isto possibilita que as amostras possam ser representadas e visualizadas em um número menor de dimensões, sem perda de informação analítica relevante.

Centrar os dados na média: procedimento de pré-processamento que tem como objetivo facilitar a extração de informações espectrais, bem como, a interpretação desses dados. Calcula-se a média das absorbâncias para cada comprimento de onda e subtrai-se cada absorbância do respectivo valor médio.

Leverage: é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de *leverage* pequeno indica que a amostra em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração.

Loadings: o quanto cada variável antiga contribui para formar as componentes principais.

Primeira derivada com alisamento: procedimento de transformação de dados que permite melhorar a separação de sinais não totalmente sobrepostos com a diminuição de ruídos instrumentais.

Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Square Regression*): método de regressão multivariada em que, tanto a matriz das variáveis independentes, como a das variáveis dependentes sofrem decomposição matricial, sendo representadas na forma de “scores” e “loadings”.

Resíduos de Student (ou resíduos studentizados): indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

Scores: são as novas coordenadas das amostras, no novo sistema de eixos.

Validação cruzada: é uma metodologia utilizada para a escolha do número de variáveis latentes baseada na avaliação da magnitude dos erros de previsão de um dado modelo de calibração.

Variáveis latentes (ou Componentes Principais): novo sistema de eixos para representar as amostras.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução nº99 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.

ABDELLATEF, H. E., AYAD, M. M., SOLIMAN, S. M. e YOUSSEF, N. F.; Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of paracetamol and drotaverine HCl in combination; **Spectrochimica Acta Part A**; v. 66; p. 1147–1151; 2007.

AHAMMAD, A. J. S., SARKER, S., RAHMAN, M. A., LEE, J.; Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at an Activated Glassy Carbon Electrode; **Electroanalysis**; v. 22; nº 6; p. 694-700; 2010.

AZULAY-ABULAFIA, L., TANAKA, R., SPINELLI, L., LEVITES, J., JORDÃO, D. N., LEÃO, R. S., CELIA, S., CAMPOS, L. C. E., ROCHA, P. C., DUQUE-ESTRADA, E. O. ; Tratamento tópico do melasma com monometil éter da hidroquinona (MMEH). Estudo de observação de eficácia de clínica; **RBM - Revista Brasileira de Medicina**, v. 60; p. 595-600, 2003.

BOSCH, M. E., SÁNCHEZ A. J. R., ROJAS F. S., OJEDA. C. B.; Recent developments in analytical determination of furosemide; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; v. 48; p. 519–532; 2008.

BRAGA, J. W. B., POPPI, R. J.; Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo; **Química Nova**; v. 27; nº 6; p. 1004-1011; 2004.

BRUNS, R. E., SCARMINIO, I. S., BARROS NETO, B.; **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**; 2ª edição; Campinas; SP: Editora da UNICAMP; 2003.

CANO, G. V., CABANES, A. L.; A generalized analysis of internal diffusion of immobilized enzyme in multi-enzyme reactions; **The Chemical Engineering Journal**; v. 56; p. 61–B67; 1994.

CHEMICAL BOOK - Chemical Search Engine. Disponível em: http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB8193447_EN.htm; acessado em 02 de outubro de 2009.

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.

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; nº 2; p. 254-260; 2008.

CORRER, C. J. Uso da calibração multivariada na determinação de ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico. Curitiba, jun. 2004. [Dissertação de Mestrado]. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná - UFPR.

CORRER, C. J., CORDEIRO, G., GASPARETTO, J., PERALTA-ZAMORA, P., PONTAROLO, R.; Determinação de Ácido Kójico em Produtos Farmacêuticos por Espectroscopia UV-Vis e Processo de Calibração Multivariada; **Acta Farmacéutica Bonaerense**; vol. 24; nº 3; p. 416-420; 2005.

DRAELOS, Z. D.; The cosmeceutical realm; **Clinics in Dermatology**; v. 26, p. 627–632; 2008.

EIRAS, S. P., COSCIONE, A. R., ANDRADE, J. C., CUSTODIO, R.; Métodos de otimização em química. Criado em 1999. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/artigo/9/89/#>; acessado em 29 de janeiro de 2009.

FARIA, O. L. V., KOETZ, P. R., SANTOS, M. S., NUNES, W. A.; Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada seqüencial (RBS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**; vol.26; n.2; p. 309-317; 2006.

FERRARO, M. C. F., CASTELLANO, P. M., KAUFMAN, T. S.; A spectrophotometric-partial least squares (PLS-1) method for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; v. 26; p. 443–451; 2001.

FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., VOLPE, P. L. O.; Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial; **Química Nova**; v. 22; nº 5; p. 724-731; 1999.

GAO, X.H., ZHANG, L., WEI, H., CHEN, H.D.; Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals; **Clinics in Dermatology**; v. 26; p. 367–374; 2008.

GARCIA, P. L., SANTORO, M. I. R. M., KEDOR-HACKMANN, E. R. M., SINGH, A. K.; Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; v. 39; p. 764-768; 2005.

GIROTTTO, G., NOGUEIRA, K. L., MOURA, J. A., SOUZA, J. B., GIACOMETTI, L. L., MARCHI, M. R. R., TOGNOLLI, J. O.; Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando

ferramentas quimiométricas; **Eclética Química**; v. 32; nº 2; p. 61-67; 2007.

GUPTA, A. K., GOVER, M. D., NOURI, K. e TAYLOR S.; The treatment of melasma: A review of clinical trials, **Journal of the American Academy of Dermatology**; v. 55; p. 1048-1065; 2006.

HARRIS, D. C.; **Análise Química Quantitativa**; 6ª edição; Rio de Janeiro, RJ; Editora: LTC, 2005.

HARRIS, D. C.; **Quantitative Chemical Analysis**; 6ª edition; New York, USA; W.H.Freeman and Co.; 2002. Disponível em, <http://bcs.whfreeman.com/qca/Expts%20for%20Web%2010%20Jul03%20d.pdf>; acessado em 28 de dezembro de 2009.

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.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JUNIOR, A. M.; Medicina Geriátrica, Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/23/saude-geriatria/melanina-e-melanogenese/>; acessado em 01 de outubro de 2009.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J.; **Histologia Básica**; 10ª edição; Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 2004.

LEITÃO, J. M. M., SILVA, J. C. G. E.; Factorial analysis optimization of a Diltiazem kinetic spectrophotometric quantification method; **Analytica Chimica Acta**; v 609; p. 1-12; 2008.

LEITÃO, J. M. M., SILVA, J. C. G. E.; PARAFAC2 and MCR-ALS quantification of Diltiazem antihypertensor based on a kinetic spectrophotometric methodology; **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**; v. 89; p. 90-96; 2007.

LIN, C.H., SHEU, J.Y., WU, H.L., HUANG, Y.L.; Determination of hydroquinone in cosmetic emulsion using microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography; **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**; v. 38; p. 414–419; 2005.

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.

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.

LITOS, C., ALETRAS, V., HATZIPANAYIOTI, D., KAMARIOTAKI, M. E LYMBEROPOULOU-KARALIOTA, A.; CV and NMR study on the reaction of Mo(VI) with 3,4-dihydroxybenzoic acid and ascorbic acid in aqueous solution; **Inorganica Chimica Acta**; 360; 2321–2330; 2007.

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**; v. 70; p. 20–24; 2009.

MANOSROI, A., ABE, M., MANOSROI, J.; Comparison of antioxidant activity of extract from seeds of white pepper (*Piper nigrum*, Linn.) to commercial antioxidants in 2% hydroquinone cream; **Journal of Cosmetic Science**; v. 50, p. 221-229; 1999.

MEHLING, J.P., SHEPHERD, J.; Spectrophotometric determination of iron in ores with Kojic Acid; **Journal of Analytical Chemistry**; v. 21; p. 642-642; 1949.

MERCK Chemicals Brazil - Produtos Químicos Industriais e Laboratoriais. Disponível em: <http://www.merck-chemicals.com.br/>; acessado em 01 de outubro de 2009.

MOMTAZ, S., MAPUNYA, B. M., HOUGHTON, P.J., EDGERLY, C., HUSSEIN, A., NAIDOO, S., LALL N.; Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening; **Journal Ethnopharmacology**; v. 119; p. 507–512; 2008.

MORITA, T. e ASSUMPÇÃO, R. M. V.; **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**; 2ª edição; São Paulo: Editora Edgard Blucher; p. 272; 1972.

MOSS, M.L. e MELLON, M. G.; Colorimetric Determination of Iron with Kojic Acid; **Industrial and Engineering Chemistry**; v. 13; p. 612-614; 1941.

NAGATA, N., BUENO, M. I. M.S., PERALTA-ZAMORA, P. G.; Métodos Matemáticos para correção de Interferências Espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de Raios-X; **Química Nova**, v. 24, nº 4, p. 531-539, 2001.

NURCHI, V. M., CRISPONI, G., LACHOWICZ, J. I., MURGIA, S., PIVETTA, T., REMELLI, M., RESCIGNO, A., NICLÓS-GUTIÉRREZ, J., GONZÁLEZ-PÉREZ, J. M., DOMÍNGUEZ-MARTÍN, A., CASTIÑEIRAS, A., SZEWCZUK, Z.; Iron(III) and aluminum(III) complexes with hydroxypyrrone ligands aimed to design kojic acid derivatives with new perspectives; **Journal of Inorganic Biochemistry**; v. 104; p. 560–569; 2010.

OHLWEILER, O. A.; **Química Analítica Quantitativa**; volume 3. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; 1976.

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.

ORDIZ, I. Melanina y agentes despigmentantes. **Revista de Medicina Estética**, n.10, ago-set, 2003. Disponível em: <http://www.medestetica.com/Cientifica/Revista/n10/melanina.htm>; acessado em 07 de janeiro de 2009.

ORTONNE, J., PASSERON, T.; Melanin Pigmentary Disorders: Treatment Update; **Dermatologic Clinics**; v. 23; p. 209-226; 2005.

PICARDO, M., CARRERA M.; New and Experimental Treatments of Cloasma and Other Hypermelanoses; **Dermatologic Clinics**; v. 25; p. 353–362; 2007.

PRIGNANO, F., ORTONNE, J., BUGGIANI, G., LOTTI, T.; Therapeutical Approaches in Melasma; **Dermatologic Clinics**; v. 25; 337–342; 2007.

RENDON, M., BERNEBURG, M., ARELLANO, I., PICARDO, M.; Treatment of melasma; **Journal of the American Academy of Dermatology**; v. 54; nº 5; p. 272-281; 2006.

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; 771-780; 2004.

ROCHA, F. R. P. e TEIXEIRA, L. S. G.; Estratégias para aumento de sensibilidade em Espectrofotometria Uv-Vis; **Química Nova**; v. 27; n. 5; 807-812; 2004.

ROSSETTO, R. F.; Princípios Ativos com ação Despigmentante. **Revista Personalité**, n.50, 2007. Disponível em: http://www.revistapersonalite.com.br/principios_ativos_despigmentante_50.php; acessado em 20 de novembro de 2009.

SKOOG, D. A.; **Fundamentals of Analytical Chemistry**; Estados Unidos: Holt, Rinehart and Wiston; p. 414, 668; 1963.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, J. A.; **Princípios de Análise Instrumental**; 5ª edição; Porto Alegre: Editora Bookman; p. 278; 2002.

VALDERRAMA, P., BRAGA, J. W. B., POPPI, R. J.; Estado da arte de figuras de mérito analítico em

calibração multivariada; **Química Nova**, v. 32; n. 5; 1278-1287; 2009.

YOON, T., CHI, L.T., YAMAGUCHI, Y., BATZER, J., WOLBER, R. e HEARING, V. J.; Reconstituted 3-dimensional human skin of various ethnic origins as an in vitro model for studies of pigmentation; **Journal Analytical Biochemistry**; v. 318; p. 260–269; 2003.