

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO KÓJICO E HIDROQUINONA POR ESPECTROFOTOMETRIA VISÍVEL E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Giselle Nathaly Calaça

Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900 Ponta Grossa - PR, Brasil

Sandra Stets e Noemi Nagata*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-990 Curitiba - PR, Brasil

Recebido em 27/7/10; aceito em 10/11/10; publicado na web em 18/2/11

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF KOJIC ACID AND HYDROQUINONE BY MULTIVARIATE CALIBRATION AND VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY. A multivariate spectrophotometric method was developed for analysis of kojic acid/hydroquinone associations in skin whitening cosmetics. The method is based on the reaction between kojic acid and Fe^{3+} and on the reduction of Fe^{3+} by hydroquinone and further complexation of Fe^{2+} with 1,10-phenanthroline. The multivariate model was developed by Partial Least Squares Regression (PLSR), using 25 synthetic mixtures and mean-centered spectral data (350-380 nm). The use of 3 (kojic acid) and 2 (hydroquinone) latent variables permits the observation of mean errors of about 5% in the external validation phase.

Keywords: kojic acid; hydroquinone; visible spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O ácido kójico (5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) é uma substância natural produzida por vários fungos e bactérias, dentre elas espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*.¹ Entre suas várias propriedades destacam-se a ação antimicrobiana e quelante de íons cobre, sendo esta última responsável pela inativação da tirosinase e, conseqüentemente, pela ação inibidora na formação de melanina.^{2,3} A hidroquinona, por sua vez, possui estrutura química similar ao precursor da melanina e atua inibindo a oxidação da tirosina em 3,4-di-hidroxifenilalanina, além de participar de outros processos metabólitos nos melanócitos.⁴ Estes mecanismos conferem à associação ácido kójico-hidroquinona ação clareadora, permitindo seu uso em preparações dermocosméticas orientadas ao tratamento tópico das discromias.

Diversas formulações contendo a associação destes princípios ativos são comercializadas no Brasil para tratamentos dermatológicos, tendo sua origem predominante em farmácias de manipulação magistral. Em função das pequenas quantidades geralmente produzidas e do elevado custo das técnicas analíticas disponíveis para a quantificação destes fármacos, usualmente cromatográficas, o controle de qualidade do produto final é praticamente inexistente. Sendo assim, a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos simples que viabilizem um rigoroso controle de qualidade deste tipo de produto farmacêutico é mais do que evidente.

Muitos métodos de análise têm sido propostos para a quantificação isolada destes fármacos ou para determinação de associações com outros princípios ativos em cosméticos (gel, creme e emulsão), envolvendo técnicas como, voltametria de onda quadrada,⁵ voltametria cíclica,⁶ cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),^{7,8} espectroscopia UV-Vis,⁹ espectrofotometria UV derivativa,¹⁰ dentre outras. Por outro lado, relatos de determinação simultânea destas espécies são pouco comuns, destacando propostas fundamentadas em métodos

cromatográficos. Huang *et al.*,¹¹ por exemplo, determinaram simultaneamente ácido kójico, hidroquinona, fosfato de ascorbil magnésio, ascorbil glucosídeo e arbutin em cosméticos por cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo desvio padrão relativo (DPR) menor que 1,3%. Na proposta de Lin *et al.*,¹ foi empregado um planejamento fatorial para otimizar o método fundamentado em cromatografia capilar eletrocínica micelar para determinação de ácido kójico, hidroquinona e arbutin, com erros relativos de validação inferiores a 3,0%. Por sua vez, Chisvert *et al.*¹² empregaram a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para determinar ácido kójico, ácido azeláico, arbutin, hidroquinona e resorcinol em cosméticos, com erros relativos inferiores a 5%.

Em função de características como alta sensibilidade, baixo custo e simplicidade operacional, a espectrofotometria UV-Vis corresponde a uma ferramenta analítica de primeira importância.¹³ Trata-se de uma técnica consolidada e de fácil implementação, prontamente aplicável em rotinas de controle de qualidade. No entanto, a baixa seletividade da técnica faz com que a ocorrência de sobreposição espectral seja bastante frequente, o que muitas vezes inviabiliza o desenvolvimento de métodos analíticos orientados à determinação de misturas.

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.^{14,15} A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas.¹⁴

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, os constituintes da base (creme ou gel) utilizados nas formulações costumam absorver com elevada intensidade nessa região. Para eliminar esta interferência é possível recorrer ao uso de derivatização química, objetivando a formação de espécies coloridas.^{16,17}

*e-mail: nnagata@ufpr.br

Tendo em vista as particularidades relatadas acima, este trabalho propôs o desenvolvimento de um método analítico orientado ao controle de qualidade da associação ácido kójico (AK) (complexando com íons Ferro (III)) e hidroquinona (HQ) (responsável pela redução do Fe (III) a Fe (II) que, posteriormente, complexa com 1,10-fenantrolina), associando a técnica de espectrofotometria na região do visível com a regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR).

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e padrões

Todos os reagentes utilizados para o preparo de soluções foram de grau analítico PA, excetuando-se os padrões de ácido kójico (All Chemistry, 99,5% de pureza) e hidroquinona (SP Farma, 99,8% de pureza) que foram de grau farmacêutico.

As soluções foram preparadas diariamente utilizando-se água destilada e vidraria analítica previamente calibrada. As soluções de trabalho foram preparadas em concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para ácido kójico e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para hidroquinona, em água destilada.

Em todos os ensaios envolvendo a determinação quantitativa dos analitos adicionou-se uma quantidade em excesso da solução de cloreto férrico ($10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 1,10-fenantrolina ($6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, solução 10% etanólica). Posteriormente, a diluição foi realizada com solução Clark Lubs (KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) de pH 3,0.

Equipamentos e programas computacionais

As análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu (2410 PC), utilizando-se o software UVPC v.3.91 (Shimadzu) e cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico, sendo os espectros adquiridos na região do visível, entre 350 e 800 nm.

Para montagem dos gráficos, utilizou-se o software Origin Pro 8.0, enquanto que na elaboração dos modelos de calibração multivariada empregou-se o pacote PLS-Toolbox v.3.0 (Eigenvector Research Inc.), que opera em ambiente Matlab v.6.5 (Mathworks Inc.).

Planejamento fatorial

Com o propósito de otimizar a reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico realizou-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central em quintuplicata, de acordo com as variáveis e níveis apresentados na Tabela 1. Foram realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados, totalizando 9 ensaios executados de forma aleatória. Em todos os ensaios do planejamento fatorial o pH foi ajustado com solução aquosa diluída de HCl.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados na reação de complexação do ácido kójico com íon férrico

Variáveis\Níveis	-	0	+
[FeCl ₃] (mol L ⁻¹)	$2,5 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-4}$
pH	3,0	4,0	5,0

Desenvolvimento dos modelos de calibração

Para o desenvolvimento de modelos convencionais (método de Vierordt¹⁸ e método usando a primeira derivada) foram elaboradas curvas analíticas individuais para ambos analitos. No caso do complexo formado entre o ácido kójico e íon férrico, a curva de calibração foi construída na faixa de concentração de AK compreendida entre $5,0 \times 10^{-5}$ e $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Para o complexo 1,10-fenantrolina-Fe²⁺,

envolvendo a determinação indireta da hidroquinona, a curva analítica foi construída na faixa de concentração de HQ compreendida entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $7,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para o método usando a primeira derivada, a curva de calibração para o AK (dA/dλ versus concentração do analito) foi elaborada no comprimento de onda em que o complexo envolvendo a determinação indireta da hidroquinona apresenta uma derivada de absorbância próxima de zero (ponto de inflexão obtido pela 1ª derivada dos dados espectrais com 9 pontos de alisamento). Procedimento similar foi utilizado para a elaboração da curva analítica para HQ.

Na construção dos modelos multivariados o conjunto de calibração constituiu-se por 25 misturas sintéticas dos analitos de interesse, dentro da faixa de concentração de $0,5 \times 10^{-4}$ a $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para o AK e $1,0 \times 10^{-5}$ a $7,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a HQ. O conjunto de validação externa (utilizado para verificar a capacidade de previsão de todos os modelos construídos) constituiu-se por 7 misturas, sendo 3 dessas em triplicata, dentro da faixa de concentração utilizada no conjunto de calibração, conforme ilustrado na Figura 1.

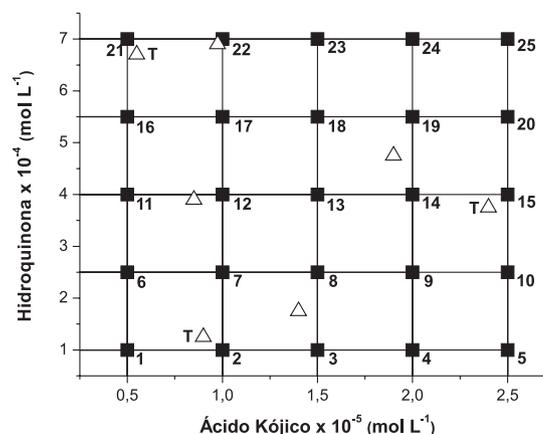


Figura 1. Planejamento experimental para obtenção das misturas do conjunto de calibração (■) e de validação externa (△)

Para elaboração dos modelos multivariados, os espectros adquiridos na região do visível (350 e 800 nm) foram centrados na média, visando reduzir a dimensão do modelo construído e facilitar a sua visualização.¹⁴

Ensaio de recuperação

O modelo de melhor capacidade de previsão para o conjunto de validação externa foi utilizado em ensaios de recuperação, utilizando-se associações AK/HQ em base gel Natrosol. Para tal, três diferentes proporções de AK e HQ foram adicionadas à base gel, de modo a totalizar cerca de 8,00 g de dermocosmético. A mistura foi então homogeneizada e, para cada uma dessas amostras, a quantificação foi realizada em triplicata. Em cada ensaio, pesou-se uma quantidade adequada do dermocosmético em balão volumétrico de 100,0 mL e diluiu-se com solução tampão Clark Lubs sob vigorosa agitação. Uma alíquota de 1000 μL dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, que foi reagida com 1000 μL de solução de cloreto férrico $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 1000 μL de solução de 1,10-fenantrolina $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de solução tampão Clark Lubs.

Análise de amostras reais

Três formulações comerciais foram obtidas em farmácias de manipulação na região de Ponta Grossa e Curitiba/PR. Para análise, pesou-se uma quantidade adequada do dermocosmético em balão de

100 mL, diluiu-se com tampão Clark Lubs e agitou-se vigorosamente até solubilização total do dermocosmético. A posterior reação de complexação foi realizada da mesma maneira descrita no ensaio de recuperação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da reação de complexação entre ácido kójico e Ferro (III)

Para otimizar a reação de complexação entre o ácido kójico e o íon férrico, em valores de pH's menores que os relatados na literatura (a fim de evitar a hidrólise do íon férrico),^{19,20} realizou-se um planejamento fatorial 2² com quintuplicata do ponto central.

Os resultados da otimização via planejamento fatorial mostram que os efeitos principais, concentração de cloreto férrico (+0,0611) e pH (+0,0219), assim como o efeito de interação (-0,0154) foram significativos, considerando-se a estimativa do desvio de 0,0132, em um nível de 90% de confiança. Na interpretação geométrica do efeito de interação [FeCl₃] x pH (Figura 2), foi possível observar que para a concentração de FeCl₃ de 2,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (nível -) um aumento de 0,0373 u.a. ocorre quando se varia o pH do nível inferior para o nível superior. No entanto, para a maior concentração de FeCl₃ (7,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) um menor aumento no valor de absorvância foi observado (0,0065 u.a.) com a modificação do pH, evidenciando que o efeito do pH depende da concentração de FeCl₃ utilizada.

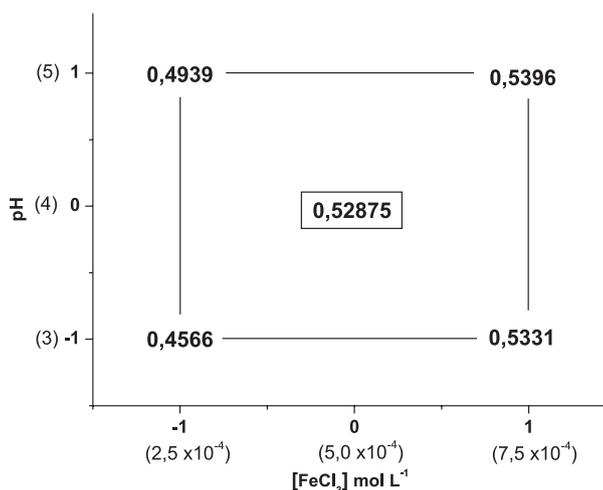


Figura 2. Interpretação geométrica do efeito de interação ([FeCl₃] x pH) no estudo da reação de complexação do ácido kójico com íon férrico

Em função do efeito positivo da concentração de íon férrico e do efeito pouco significativo do pH, para elevadas concentrações de íon férrico, o planejamento preliminar foi deslocado na direção de maiores concentrações de íon férrico (9,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), mantendo-se os valores de pH explorados inicialmente.

Levando-se em consideração a estimativa do desvio (0,0153) e um nível de confiança de 90%, observou-se que os efeitos principais e de interação não foram significativos neste novo planejamento.

Sendo assim, concluiu-se que para concentrações de FeCl₃ acima de 7,5 x 10⁻⁴ 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. Em função desses resultados e para evitar qualquer possibilidade de hidrólise do Fe³⁺, optou-se por utilizar em todas as análises um tampão inorgânico conhecido como Clark-Lubs (HCl/KCl) em pH 3,0 e uma concentração maior de FeCl₃.

Métodos convencionais de calibração

De acordo com a sequência de espectros apresentada na Figura 3, a reação entre ácido kójico e íon férrico (Equação 1)²¹ leva à formação de um complexo que absorve fortemente na região do visível, apresentando um máximo centrado em 494 nm. Por sua vez, o complexo formado entre 1,10-fenantrolina e íon ferroso (Equação 3), resultante da reação preliminar entre hidroquinona e íon férrico (Equação 2), absorve na mesma região espectral, apresentando um máximo centrado em 510 nm. Embora curvas analíticas de ótima linearidade possam ser construídas (Equações 4 e 5), sistemas de calibração convencionais se mostram inviáveis, em razão da extrema proximidade dos máximos de absorção (Figura 3). Trata-se de uma constatação que justifica o uso de sistemas diferenciados de calibração para a determinação simultânea das espécies em estudo.

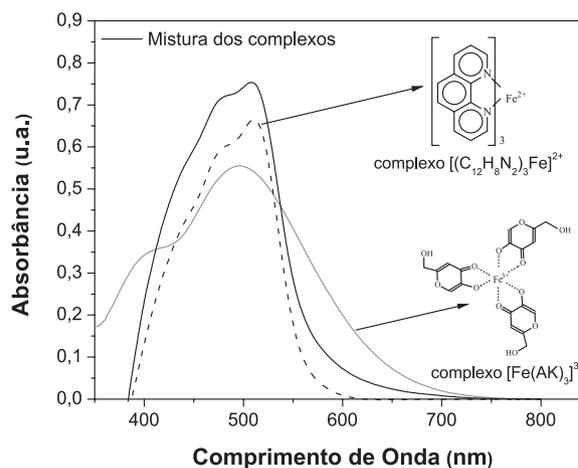
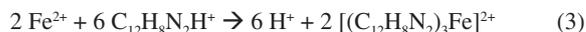
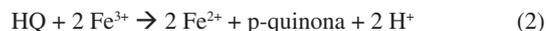
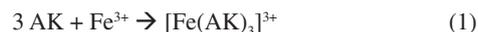


Figura 3. Espectros de absorção do complexo AK/Fe³⁺ ([AK] = 4,5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), do complexo Fe²⁺/o-fenantrolina (após redução do Fe³⁺ pela [HQ] = 3,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) e da mistura



$$A_{494 \text{ nm}} = 0,00224 + 1206,1 [\text{AK}] \quad (\text{R}=0,9998) \quad (4)$$

$$A_{510 \text{ nm}} = -0,00763 + 21906,6 [\text{HQ}] \quad (\text{R}=0,9992) \quad (5)$$

Para a quantificação das misturas pelo método de Vierordt, curvas analíticas foram elaboradas para cada espécie em estudo, em dois comprimentos de onda (494 e 510 nm), a partir das quais foram calculados os respectivos coeficientes de absorvância molar (ϵ). A concentração de AK e HQ foi finalmente calculada, resolvendo-se o sistema de equações apresentado a seguir:

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

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

onde A: absorvância, C: concentração (mol L⁻¹), ϵ : absorvância molar dos complexos obtida através do coeficiente angular das retas.

Como podemos observar nos resultados apresentados na Tabela 2, os erros relativos médios obtidos na quantificação dos analitos

Tabela 2. Concentrações previstas na análise de misturas sintéticas contendo AK e HQ (conjunto de validação externa) pelos métodos convencionais de calibração

Concentração real (mol L ⁻¹)		Concentração prevista (mol L ⁻¹)			
AK	HQ	Método Vierodt		Método usando a primeira derivada	
		AK	HQ	AK	HQ
5,50 x 10 ⁻⁵	6,70 x 10 ⁻⁵	1,09 x 10 ^{-4*} (5,29 x 10 ⁻⁶)**	3,37 x 10 ^{-5*} (5,00 x 10 ⁻⁷)**	2,12 x 10 ^{-4*} (9,50 x 10 ⁻⁶)**	3,16 x 10 ^{-5*} (5,29 x 10 ⁻⁷)**
9,00 x 10 ⁻⁵	1,25 x 10 ⁻⁵	1,12 x 10 ^{-4*} (6,93 x 10 ⁻⁶)**	7,96 x 10 ^{-6*} (2,22 x 10 ⁻⁷)**	2,09 x 10 ^{-4*} (1,21 x 10 ⁻⁵)**	4,71 x 10 ^{-6*} (3,42 x 10 ⁻⁷)**
2,40 x 10 ⁻⁴	3,75 x 10 ⁻⁵	3,05 x 10 ^{-4*} (3,06 x 10 ⁻⁶)**	2,28 x 10 ^{-5*} (2,52 x 10 ⁻⁷)**	3,91 x 10 ^{-6*} (0)**	1,43 x 10 ^{-5*} (4,04 x 10 ⁻⁷)**
1,90 x 10 ⁻⁴	4,75 x 10 ⁻⁵	2,46 x 10 ⁻⁴	2,69 x 10 ⁻⁵	3,28 x 10 ⁻⁴	2,09 x 10 ⁻⁵
9,75 x 10 ⁻⁵	6,90 x 10 ⁻⁵	1,54 x 10 ⁻⁴	3,59 x 10 ⁻⁵	2,46 x 10 ⁻⁴	3,29 x 10 ⁻⁵
8,50 x 10 ⁻⁵	3,90 x 10 ⁻⁵	1,25 x 10 ⁻⁴	2,39 x 10 ⁻⁵	2,28 x 10 ⁻⁴	2,11 x 10 ⁻⁵
1,40 x 10 ⁻⁴	1,75 x 10 ⁻⁵	1,78 x 10 ⁻⁴	1,17 x 10 ⁻⁵	2,72 x 10 ⁻⁴	6,37 x 10 ⁻⁶
Erro Relativo Médio (%)		47,11	41,44	144,48	57,59

* Média das triplicatas, ** Estimativa do desvio padrão da triplicata.

são elevados, demonstrando a ineficiência deste procedimento na presença de interferência espectral tão severa quanto a envolvida neste estudo.

Para aplicação do método usando a primeira derivada, foi realizada inicialmente a derivação de primeira ordem dos dados espectrais para determinação do ponto de anulação. No caso do ácido kójico, um ponto de inflexão com derivada zero é observado em 495 nm, comprimento de onda em que foi construída a curva analítica para a determinação de HQ (Equação 6). Para a hidroquinona o ponto de inflexão ocorre em 510 nm, comprimento em que foi construída a curva analítica para determinação de AK (Equação 7).

$$dAbs = -1,83 \times 10^{-6} + 91,48 [HQ] \quad (R=0,998) \quad (6)$$

$$dAbs = 6,70 \times 10^{-4} - 6,089 [AK] \quad (R=0,961) \quad (7)$$

Utilizando-se este método de calibração foram observados erros relativos médios extremamente elevados (Tabela 2), provavelmente em decorrência da baixa intensidade do sinal derivado e da consequente falta de linearidade observada, particularmente para ácido kójico.

Os elevados erros de previsão observados na aplicação de métodos convencionais de calibração justificam o desenvolvimento de modelos multivariados, os quais frequentemente permitem boa capacidade preditiva, mesmo na presença de elevada interferência espectral.

Calibração multivariada

Os modelos de calibração foram desenvolvidos a partir de 25 misturas sintéticas, utilizando-se o sinal espectral (350 a 800 nm) centrado na média. A capacidade preditiva dos modelos foi avaliada frente ao mesmo conjunto de validação externa utilizado para avaliar os métodos convencionais de calibração.

O desenvolvimento dos modelos multivariados foi realizado empregando-se o método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR) e procedimento de validação cruzada (*leave one out*), este último utilizado 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 da soma dos erros da validação cruzada (RMSECV) e a raiz quadrada da soma dos erros de calibração (RMSEC).

A evolução dos valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes (VLs) dos modelos PLSR para determinação

de ácido kójico e hidroquinona é apresentada na Figura 4. A partir destes antecedentes foi possível observar que a inclusão de mais do que 3 VLs, para AK, ou 2 VLs, para HQ não redundam em significativa minimização dos erros de previsão, ao mesmo tempo em que pode contribuir com a elaboração de modelos superestimados e pouco robustos. Para o número de VLs otimizados, as variâncias capturadas foram 99,99% (matriz X) e 99,85% (matriz Y) para AK e 99,96% (matriz X) e 98,57% (matriz Y) para HQ.

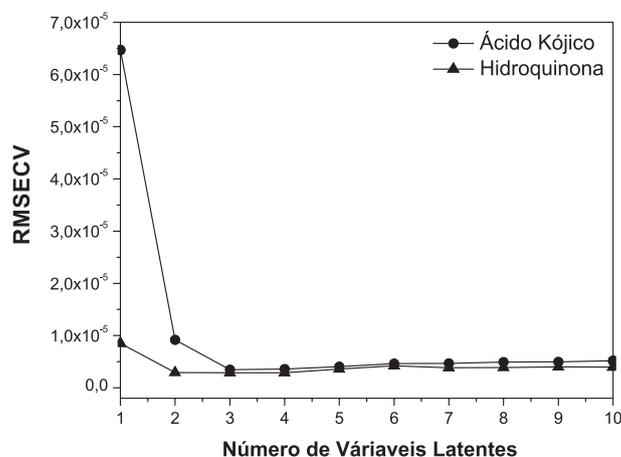


Figura 4. Evolução da raiz quadrada da soma dos erros da validação cruzada (RMSECV) em função do número de variáveis latentes para modelo multivariado orientado à quantificação de ácido kójico e hidroquinona

Outra característica importante dos modelos multivariados desenvolvidos foi a ausência de amostras anômalas no conjunto de calibração, característica que foi confirmada pela avaliação dos parâmetros de *leverage* e resíduos de *Student* (resultados não apresentados).

A boa capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos pode ser preliminarmente avaliada pelos excelentes valores de coeficiente de correlação apresentados pelos gráficos de valores reais por previstos na fase de validação cruzada (Figura 5), obtidos para modelos elaborados com 3 VLs (AK) e 2 VLs (HQ). Adicionalmente, valores de RMSECV e RMSEC de $3,45 \times 10^{-6}$ e $2,72 \times 10^{-6}$ (AK) e de $2,93 \times 10^{-6}$ e $2,53 \times 10^{-6}$ (HQ) são pelo menos uma ordem de grandeza inferior à concentração dos analitos nos padrões do conjunto de calibração, o que, em média, implica em boa capacidade de previsão.

Finalmente, a capacidade de previsão dos modelos PLSR desenvolvidos e otimizados também foi analisada por um conjunto de validação externa, cujos resultados são apresentados na Tabela 3. Analisando os resultados obtidos na determinação de hidroqui-

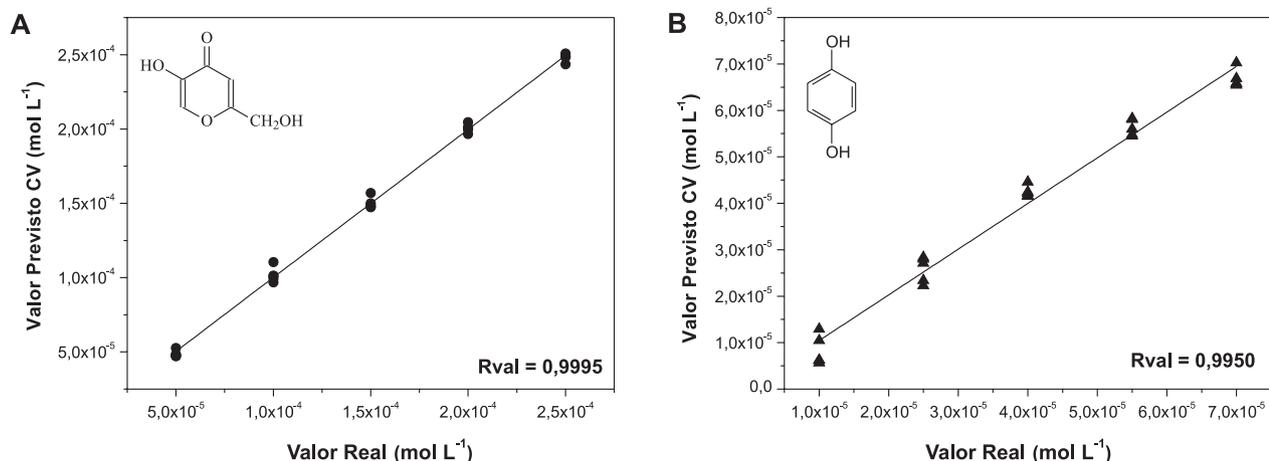


Figura 5. Valores previstos vs valores reais de ácido kójico (A) e hidroquinona (B) no processo de validação cruzada

Tabela 3. Concentrações previstas na análise de misturas sintéticas contendo AK e HQ (conjunto de validação externa) pelos métodos multivariados de calibração

Concentração real (mol L ⁻¹)		Modelo AK		Modelo HQ	
AK	HQ	[AK] prevista (mol L ⁻¹)	E _{Relativo} (%)	[HQ] prevista (mol L ⁻¹)	E _{Relativo} (%)
5,50 x 10 ⁻⁵	6,70 x 10 ⁻⁵	5,61 x 10 ^{-5*} (4,25 x 10 ⁻⁶)**	6,61*	6,21 x 10 ⁻⁵ (1,31 x 10 ⁻⁶)**	-7,31*
9,00 x 10 ⁻⁵	1,25 x 10 ⁻⁵	8,35 x 10 ^{-5*} (2,20 x 10 ⁻⁶)**	-7,22*	1,26 x 10 ^{-5*} (7,51 x 10 ⁻⁶)**	4,27*
2,40 x 10 ⁻⁴	3,75 x 10 ⁻⁵	2,38 x 10 ^{-4*} (1,53 x 10 ⁻⁶)**	-0,97*	4,10 x 10 ^{-5*} (5,51 x 10 ⁻⁶)**	9,23*
1,90 x 10 ⁻⁴	4,75 x 10 ⁻⁵	1,87 x 10 ⁻⁴	-1,58	4,81 x 10 ⁻⁵	1,26
9,75 x 10 ⁻⁵	6,90 x 10 ⁻⁵	1,00 x 10 ⁻⁴	2,56	6,46 x 10 ⁻⁵	-6,38
8,50 x 10 ⁻⁵	3,90 x 10 ⁻⁵	8,59 x 10 ⁻⁵	1,06	4,10 x 10 ⁻⁵	5,13
1,40 x 10 ⁻⁴	1,75 x 10 ⁻⁵	1,33 x 10 ⁻⁴	-5,00	1,81 x 10 ⁻⁵	3,43
Erro Relativo Médio (%)			4,20		6,05

* Média das triplicatas, ** Estimativa do desvio padrão da triplicata.

Tabela 4. Resultados do ensaio de recuperação de AK e HQ em amostras sintéticas contendo base gel Natrosol[®] pelos métodos multivariados de calibração

	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	AK (2%)	HQ (2%)	AK (2%)	HQ (1%)	AK (4%)	HQ (1%)
Valor previsto (mol L ⁻¹)	1,18 x 10 ⁻³	1,29 x 10 ⁻³	1,14 x 10 ⁻³	7,39 x 10 ⁻⁴	2,29 x 10 ⁻³	7,11 x 10 ⁻⁴
	1,19 x 10 ⁻³	1,46 x 10 ⁻³	1,12 x 10 ⁻³	7,06 x 10 ⁻⁴	2,15 x 10 ⁻³	7,85 x 10 ⁻⁴
	1,25 x 10 ⁻³	1,31 x 10 ⁻³	1,16 x 10 ⁻³	7,15 x 10 ⁻⁴	2,20 x 10 ⁻³	6,76 x 10 ⁻⁴
Média (mol L ⁻¹)	1,21 x 10 ⁻³	1,35 x 10 ⁻³	1,14 x 10 ⁻³	7,20 x 10 ⁻⁴	2,21 x 10 ⁻³	7,24 x 10 ⁻⁴
Valor real (mol L ⁻¹)	1,13 x 10 ⁻³	1,45 x 10 ⁻³	1,12 x 10 ⁻³	7,32 x 10 ⁻⁴	2,25 x 10 ⁻³	7,33 x 10 ⁻⁴
Recuperação	107%	93,1%	102%	98,4%	98,4%	98,8%

nona e de ácido kójico é possível observar baixos valores de erro relativo, o que indica uma melhora significativa na capacidade de previsão dos modelos multivariados em relação aos modelos convencionais.

Análise de amostras reais

Inicialmente, a capacidade de recuperação do método multivariado desenvolvido foi avaliada frente a amostras sintéticas, contendo quantidades conhecidas do padrão de AK e HQ em uma base frequentemente utilizada para a elaboração de dermocosméticos (base gel Natrosol[®]). Os resultados deste ensaio (Tabela 4) indicam boas taxas de recuperação para ambos fármacos (93 a 107%), o que implica em baixa interferência por parte da base.

Posteriormente, 3 amostras obtidas em farmácias magistrais foram submetidas à análise, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 5. De maneira geral, observa-se que amostras contendo

Tabela 5. Resultado da análise de amostras reais utilizando-se o método multivariado desenvolvido

Dermocosméticos	Concentração declarada (% m/m)		Concentração prevista (% m/m)		Erro (%)	
	AK	HQ	AK	HQ	AK	HQ
Manipulado 1	2,00	2,00	2,18	1,82	9,00	-9,00
Manipulado 2	2,00	2,00	2,12	1,93	6,00	-3,50
Manipulado 3	1,00	1,00	1,14	1,12	14,00	12,00

elevada concentração dos fármacos (2% m/m) podem ser previstas com sucesso, com erros de previsão inferiores a 10%. Contrariamente, amostras que apresentam baixa concentração relativa dos fármacos (manipulado 3) são previstas com menor exatidão, apresentando erros superiores a 10%. Neste caso, é possível supor um efeito inter-

ferente por parte dos ingredientes da fórmula, a qual, além da base antes mencionada, costuma conter excipientes como propilparabeno (0,15%), metilparabeno (0,15%), vitamina E (0,5%), vitamina C (0,5%) e EDTA (0,25%).

CONCLUSÕES

Em função da severa interferência espectral observada entre os complexos em estudo, os métodos convencionais de calibração (método de Vierodt e método usando a primeira derivada) se mostram inadequados para a determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona (erros de previsão superiores a 40%).

Por sua vez, a técnica de calibração multivariada (PLSR) se apresentou satisfatória para a quantificação desta associação em misturas sintéticas, proporcionando erros relativos médios de previsão de 4,20% (ácido kójico) e 6,05% (hidroquinona).

Na análise de amostras reais, maiores erros relativos foram encontrados para formulações contendo uma menor concentração relativa dos clareadores, provavelmente em função da interferência dos conservantes (vitamina E, vitamina C e/ou EDTA).

É pertinente salientar, finalmente, que o método desenvolvido se mostrou promissor para aplicação em rotinas de controle de qualidade, por se tratar de uma técnica rápida e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

1. Lin, Y.; Yang, Y.; Wu, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 279.
2. Cano, G. V.; Cabanes, A. L.; *Chem. Eng. J.* **1994**, *56*, 61.
3. Draelos, Z. D.; *Clin. Dermatol.* **2008**, *26*, 627.
4. Picardo, M.; Carrera, M.; *Dermatol. Clin.* **2007**, *25*, 353.
5. Oliveira, I. R. W. Z.; Osório, R. E. M. B.; Neves, A.; Vieira, I. C.; *Sens. Actuators, B* **2007**, *122*, 89.
6. Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O.; *Talanta* **2000**, *52*, 681.
7. Lin, C. H.; Sheu, J. Y.; Wu, H. L.; Huang, Y. L.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 414.
8. Lin, C. H.; Wu, H. L.; Huang, Y. L.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *581*, 102.
9. Correr, C. J.; Cordeiro, G.; Gasparetto, J.; Peralta-Zamora, P.; Pontarolo, R.; *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, *24*, 416.
10. Garcia, P. L.; Santoro, M. I. R. M.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; Singh, A. K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 764.
11. Huang, S. C.; Lin, C. C.; Huang, M. C.; Wen, K. C.; *J. Food Drug Anal.* **2004**, *12*, 13.
12. Chisvert, A.; Sisternes, J.; Balaguer, A.; Salvador, A.; *Talanta* **2010**, *81*, 530.
13. Bosch, M. E.; Sánchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 519.
14. Nagata, N.; Bueno, M. I. M. S.; Peralta-Zamora, P. G.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 531.
15. Cordeiro, G. A.; Peralta-Zamora P.; Nagata, N.; Pontarollo, R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 254.
16. Leitão, J. M. M.; Silva, J. C. G. E.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2007**, *89*, 90.
17. Amin, A. S.; Ragab, G. H.; Saleh, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 1347.
18. Abdellatef, H. E.; Ayad, M. M.; Soliman, S. M.; Youssef, N. F.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2007**, *66*, 1147.
19. Moss, M. L.; Mellon, M. G.; *J. Ind. Eng. Chem.* **1941**, *13*, 612.
20. Mehling, J. P.; Shepherd, J.; *J. Anal. Chem.* **1949**, *21*, 642.
21. 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.; Castiñeras, A.; Szwecuk, Z.; *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 560.