UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA EM
COSMÉTICOS E MEDICAMENTOS**

Pedro López García

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Titular Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

São Paulo
2004

Pedro López García

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA EM COSMÉTICOS E
MEDICAMENTOS

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
1º Examinador

Profa. Dra. Vera Lúcia Borges Isaac Rangel
2º Examinador

São Paulo, 27 de fevereiro de 2004

*Bem-aventurado o homem que encontra
sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento, pois ela é mais proveitosa do
que a prata, e dá mais lucro do que o ouro.*

Prov. 3:13-14

*Agradezco a DIOS creador del
universo por haberme dado capacidad
y conocimiento para poder superar
esta etapa de mi vida...*

*A mis padres Pedro y Carmen.
A mi hermana Leslie, por el
apoyo y comprensión a pesar de
la grande distancia.*

*À Profa. Dr^a Érika Rosa Maria
Kedor-Hackmann pela orientação,
atenção, apoio e incentivo no
percurso deste trabalho.*

*A Tatiane R. Ramos por haberme
llenado el vacío de mi
individualidad y por disfrutar del
momento de sentirme completo.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Jorge Luis Seferin Martins, pela amizade, apoio, solidariedade e confiança.

Ao Prof. Anil Kumar Singh, pelas sugestões.

Às minhas colegas, Ixis Ivette Taymes Hidalgo, Elizângela Abreu Dutra, Patrícia Marques Machado, Clarice Yakabe, Fátima Silva, Andréia Peraro e Najla Mohamed Kassab, pelo companheirismo e colaboração.

Aos funcionários Regina Rojas, Iria da Silva, Maria Goretti Farias, Elizabete Paiva, Elaine Ychico, Jorge Alves de Lima, Elena de Oliveira, Lazara Correa e Leila Bonadio pela colaboração na realização desta pesquisa e amizade.

Ao Programa de Estudantes Convenio de Pós-Graduação (PEC/PG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido ao desenvolvimento da pesquisa (processo 190035/02-1).

Ao Laboratório Stiefel S. A., São Paulo, Brasil, pelo fornecimento da hidroquinona matéria-prima.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

	Página
1. INTRODUÇÃO	02
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 Generalidades	05
2.2 Propriedades físicas	05
2.3 Propriedades químicas	06
2.4 Processos de produção industrial	07
2.5 Melanina	10
2.6 Atividade farmacológica da hidroquinona	11
2.7 Espectrofotometria derivada	15
2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência	19
2.9 Métodos de análise de hidroquinona em cosméticos	22
2.10 Métodos de análise de hidroquinona em fluidos biológicos	25
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL	30
4.1.1 Solventes e soluções	30
4.1.2 Substância empregada como padrão	30
4.1.3 Matérias-primas	31
4.1.4 Amostras	31
4.1.4.1 Placebos (bases)	31
4.1.4.2 Solução de hidroquinona 20%	32
4.1.4.3 Amostras manipuladas	32
4.1.4.4 Amostras industrializadas	33
4.1.5 Preparação das amostras manipuladas	33

4.1.5.1	Preparação dos placebos (bases).....	33
4.1.5.2	Preparação dos géis.....	34
4.1.5.3	Preparação dos cremes.....	34
4.1.6	Equipamentos.....	34
4.2	MÉTODOS.....	35
4.2.1	Caracterização da matéria-prima.....	35
4.2.1.1	Identificação.....	35
4.2.1.1.1	Espectrometria no infravermelho.....	35
4.2.1.1.2	Espectrofotometria no ultravioleta (UV).....	35
4.2.1.1.3	Cromatografia em camada delgada.....	35
4.2.1.2	Ensaio baseado em medida física.....	36
4.2.1.2.1	Faixa de fusão.....	36
4.2.1.3	Ensaio de pureza.....	36
4.2.1.3.1	Perda por dessecação.....	36
4.2.1.3.2	Teor de água (método Karl-Fischer).....	37
4.2.1.3.3	Resíduo pela incineração.....	37
4.2.1.3.4	Doseamento.....	37
4.2.2	Análise das amostras manipuladas e industrializadas.....	38
4.2.2.1	Linearidade.....	38
4.2.2.1.1	Parâmetros estabelecidos.....	38
4.2.2.1.2	Construção da curva de Ringbom.....	38
4.2.2.1.3	Construção da curva de calibração.....	39
4.2.2.2	Pesquisa de interferentes.....	39
4.2.2.3	Método espectrofotométrico derivado no UV.....	40
4.2.2.3.1	Parâmetros estabelecidos.....	40
4.2.2.3.2	Construção da curva de calibração.....	40
4.2.2.3.3	Pesquisa de interferentes.....	41
4.2.2.3.4	Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas.....	41
4.2.2.3.5	Teste de recuperação.....	42
4.2.2.3.6	Determinação do limite de detecção e quantificação.....	43
4.2.2.4	Método cromatográfico.....	44
4.2.2.4.1	Parâmetros estabelecidos.....	44
4.2.2.4.2	Construção da curva de calibração.....	44

4.2.2.4.3	Pesquisa de interferentes.....	44
4.2.2.4.4	Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas.....	45
4.2.2.4.5	Teste de recuperação.....	46
4.2.2.4.6	Determinação do limite de detecção e quantificação.....	47
4.2.2.5	Comparação estatística dos métodos propostos.....	47
5.	RESULTADOS.....	51
5.1	Identificação.....	51
5.1.1	Espectro no infravermelho.....	51
5.1.2	Espectro no ultravioleta.....	52
5.1.3	Cromatograma em camada delgada.....	53
5.2	Ensaio de qualidade baseado em medidas físicas.....	54
5.2.1	Faixa de fusão.....	54
5.3	Ensaio de pureza.....	54
5.3.1	Perda por dessecação.....	54
5.3.2	Teor de água (método Karl-Fischer).....	55
5.3.3	Resíduo pela incineração.....	55
5.3.4	Doseamento.....	55
5.4	Metodologia analítica.....	56
5.4.1	Método espectrofotométrico direto no UV.....	56
5.4.1.1	Construção da curva de Ringbom.....	56
5.4.1.2	Construção da curva de calibração.....	58
5.4.1.3	Pesquisa de interferentes.....	60
5.4.2	Método espectrofotométrico derivado no UV.....	61
5.4.2.1	Construção da curva de calibração.....	61
5.4.2.2	Pesquisa de interferentes.....	63
5.4.2.3	Determinação do teor de hidroquinona.....	64
5.4.2.4	Teste de recuperação.....	66
5.4.2.5	Determinação do limite de detecção e quantificação.....	67
5.4.3	Método cromatográfico.....	68
5.4.3.1	Construção da curva de calibração.....	68
5.4.3.2	Pesquisa de interferentes.....	69
5.4.3.3	Determinação do teor de hidroquinona.....	70

5.4.3.4	Teste de recuperação.....	72
5.4.3.5	Determinação do limite de detecção e quantificação.....	73
5.5	Comparação estatística dos métodos propostos.....	74
6.	DISCUSSÃO.....	76
7.	CONCLUSÕES.....	88
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

RESUMO

As hiperpigmentações da pele são devidas à abundante produção de melanina pelos melanócitos, sejam estes em número normal ou aumentado. Várias formulações cosméticas e medicamentosas têm sido produzidas nas formas de géis e cremes contendo hidroquinona como único princípio ativo, sendo de forma industrializada e manipulada. Conseqüentemente é necessário o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para determinações quantitativas da hidroquinona nos produtos comercializados a fim de ter métodos confiáveis, de baixo custo e de pouco impacto ambiental. Os objetivos da pesquisa foram caracterizar a hidroquinona matéria-prima para garantir seu uso nas formulações farmacêuticas bem como determiná-la quantitativamente em formulações cosméticas e medicamentos nas formas de géis e cremes. As metodologias propostas foram espectrofotometria derivada no UV e cromatografia líquida de alta eficiência.

O método espectrofotométrico no UV derivado foi validado utilizando H_2SO_4 0,1 N como solvente, as leituras foram feitas a 302,0 nm na derivada de primeira ordem. O coeficiente de correlação foi de 0,9999; a média dos teores de hidroquinona nos géis e cremes foi de 101,7 e 97,6% respectivamente e as médias dos desvios padrões relativos de 0,839% para géis e 0,878% para cremes.

A determinação pelo método cromatográfico, foi realizada utilizando uma coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm), fase móvel constituída por metanol-água (80:20 v/v), vazão de 1,0 mL/min e detecção UV a 289 nm. O coeficiente de correlação foi de 0,9999; a média dos teores de hidroquinona nos géis e cremes foi de 102,2 e 98,4% respectivamente e as médias dos desvios padrões relativos de 0,882% para géis e 1,252% para cremes.

Os resultados das precisões e teores de hidroquinona foram tratados estatisticamente (testes de F e t respectivamente), e não se observou diferença significativa nos dois métodos propostos para um nível de confiança de 95%.

ABSTRACT

The excessive pigmentation of skin is due to abundant production of melanin by melanocytes located in the skin epidermal layers. Several cosmetic and pharmaceutical formulations had been industrialized as well as compounded in pharmacy such as gel and creams containing hydroquinone as a unique active ingredient. The quantitative determination of hydroquinones present in these formulations necessitates validated analytical methods that are reliable, economical and ecologically favorable. The objectives of this research were characterization of hydroquinone raw material to assure its use in pharmaceutical and cosmetic preparations as well as its quantitative determination in gel and cream formulations. A first derivative UV spectrophotometric and a high-performance liquid-chromatographic method are proposed.

The UV first derivative spectrophotometric method was validated using H_2SO_4 0.1 N as solvent and absorptions were taken at 302.0 nm. The linearity data showed a correlation coefficient of 0.9999. The mean hydroquinone content of gels and creams were 101.7 and 97.6% with mean relative standard deviations of 0.839 and 0.878% respectively.

The chromatographic method was validated using LiChrospher[®], 100 RP-18 (5 μm) column, mobile phase composed of water:methanol (80:20 v/v), at a flow rate of 1.0 mL/min and UV detection at 289 nm. The linearity correlation coefficient was 0.9999. The mean hydroquinone content of gels and creams were 102.2 and 98.4% with mean relative standard deviations of 0.882 and 1.252% respectively.

The precisions and hydroquinone content data were statistically analyzed (F and t tests), no significant difference was observed between results obtained by proposed methods at 95% confidence level.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As desordens da hiperpigmentação da pele são causadas pela abundante produção de melanina, seja por um número normal ou aumentado de melanócitos, seja por desordens hormonais.

A hidroquinona tem sido formulada por décadas em cremes, géis e loções tópicas para o tratamento das desordens da hiperpigmentação. É reconhecida como o agente despigmentante mais eficiente, mesmo podendo provocar irritações dérmicas, iniciar processos citotóxicos ou desenvolver outras reações adversas. Pertence ao grupo dos fenóis e, assim como a maior parte dos compostos deste grupo, sofre oxidação facilmente, sendo esta reação muito sensível à presença de íons metálicos, altas concentrações de oxigênio, pH elevado e luz. Nos Estados Unidos da América do Norte, a hidroquinona estudada como princípio ativo pelo “Food and Drug Administration” (FDA, 1978 e 1982), foi considerada segura e efetiva como agente despigmentante em concentrações de 1,5 – 2,0%. A máxima concentração autorizada pelo FDA para a comercialização da hidroquinona em produto cosmético é de 2,0%; concentrações acima desta devem ser controladas e supervisionadas cuidadosamente pelo médico e pelo farmacêutico (MAIBACH e OLDMAN, 1999). Os efeitos da hidroquinona são transitórios, e concentrações menores que 3,0% não provocam sensibilidade, porém concentrações maiores que 5,0% podem provocar irritação localizada.

Atualmente no Brasil a hidroquinona é comercializada com os nomes de Solaquin[®], Clariderm[®], Claripel[®] (DEF 2002/2003), e é amplamente manipulada nas farmácias, sendo os cremes e géis as formas farmacêuticas mais empregadas.

A Farmacopéia Brasileira quarta edição (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996), ainda não possui uma metodologia analítica para a determinação da hidroquinona em formulações comerciais, nem as Farmacopéias Britânica e Européia (BRITISH Pharmacopoeia, 1999), (EUROPEAN Pharmacopoeia, 1996). O presente trabalho tem como objetivo propor metodologias analíticas novas mediante as técnicas espectrofotometria derivada e cromatografia líquida de alta eficiência bem como testar as já existentes para análise da matéria-prima.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Generalidades

O primeiro pesquisador a descrever a hidroquinona foi Woehler em 1844, que adicionou hidrogênio à 1,4-benzoquinona obtendo por via sintética o 1,4-dihidroxibenzeno. A hidroquinona encontra-se na natureza como hidroquinona β -D-glicopiranosido (arbutina), nas folhas de várias plantas tais como “uva-ursi”, e algumas variedades da pêra; freqüentemente está associada ao seu éter metílico (metilarbutina). A hidroquinona é um derivado fenólico, cujo nome em latim é *hydrochinonum*, nome químico 1,4-benzenediol. Possui os seguintes sinônimos, 1,4-dihidroxibenzeno, quinol, hidroquinol, benzoquinol, p-hidroxifenol. Número CAS 123-31-9 (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977), (KIRK-OTHMER, 1998), (MERCK, 2001), (ULLMANN'S, 1999).

2.2 Propriedades físicas

A hidroquinona apresenta-se sob forma de cristais brancos. Existem três formas cristalinas, a α estável (faixa de fusão 173,8 – 174,8° C) como cristais em forma de agulhas hexagonais obtida pela cristalização em água; a β instável cristais em forma de agulhas ou prismas, obtida pela cristalização em metanol ou isopropanol e a γ instável (ponto de fusão 169° C) cristais prismáticos obtidos por sublimação (ULLMANN'S, 1999).

A hidroquinona possui fórmula molecular $C_6H_6O_2$, e peso molecular de 110,1, ponto de ebulição de 285° C, pK_{a1} 9,91, pK_{a2} 12,04, densidade relativa de 1,36 a 20°/4° C, solúvel em água, álcool e clorofórmio (MERCK, 2001).

A hidroquinona apresenta a seguinte estrutura química:

Figura 1. Estrutura química da hidroquinona.

2.3 Propriedades químicas

A hidroquinona é facilmente oxidada pela exposição ao ar ou ainda em soluções neutras e o processo acelera-se em soluções alcalinas. A reação é representada pela seguinte equação:

Figura 2. Reação de oxidação da hidroquinona (CONNORS, et al., 1986), (ULLMANN'S, 1999).

Ainda que em soluções aquosas não existam elétrons livres, o estado de ionização da hidroquinona é afetado pelo pH da solução. Devido a este fato, a oxidação da hidroquinona é mais exatamente descrita pela equação:

Figura 3. Reação de oxidação da hidroquinona em solução (CONNORS, et al., 1986).

A cinética de oxidação da hidroquinona parece ser dependente da concentração da quinona, um produto intermediário da reação que catalisa a oxidação. A quinona reage com o diânion da hidroquinona para formar um radical semiquinona instável, o qual reage rápida e espontaneamente com o oxigênio, formando duas moléculas de quinona e peróxido de hidrogênio, ou formando um dímero estável.

Figura 4. Cinética da reação de oxidação da hidroquinona (CONNORS, et al., 1986).

2.4 Processos de produção industrial

Três processos são usados na indústria para a produção de hidroquinona: hidroperoxidação de p-diisopropilbenzeno, hidroxilação do fenol e oxidação da anilina. Ainda que outros processos sejam conhecidos, não têm importância industrial (KIRK-OTTMER, 1998), (ULLMANN'S, 1999).

- **Hidroperoxidação de p-diisopropilbenzeno**

O p-diisopropilbenzeno (p-DIPB) é produzido pela reação de Friedel-Craft, isto é, alquilação do benzeno com propano. O p-DIPB é transformado em diidroperóxido (DHP) por oxidação do ar em condições levemente alcalinas a 80° – 90° C (Figura 5). O DHP é separado da mistura dos produtos por extração ou cristalização, e transformado em hidroquinona e acetona por

catálise ácida com o reagente de Hock (ácido sulfúrico 0.2 - 1.0%, a 60 – 80° C), em seguida a hidroquinona é cristalizada e isolada. O rendimento é aproximadamente 80%.

Figura 5. Síntese da hidroquinona mediante a hidroperoxidação de p-diisopropilbenzeno (KIRK-OTHMER, 1998), (ULLMANN'S, 1999).

- **Hidroxilação do fenol**

A hidroxilação do fenol é catalisada por peróxido de hidrogênio a 70% e a 80° C, produzindo uma mistura de hidroquinona e catecol (Figura 6). A catálise pode ser realizada com um ácido mineral forte, sais de ferro (II) ou cobalto (II). Dependendo do catalizador utilizado, a proporção de catecol e hidroquinona pode variar de 3:1 a 0,1:1; na prática a proporção é 1,5:1, sendo o catecol o produto formado em maior quantidade. O processo de reação envolve um mecanismo iônico, no qual o peróxido de hidrogênio é polarizado por catálise de um ácido forte, o fenol é hidroxilado resultando uma mistura de isômeros os quais são separados por uma série de extrações com solventes. O uso de vanádio modificado na oxidação do fenol dá uma proporção hidroquinona e catecol 12,5:1. A utilização de condições seletivas na hidroxilação do fenol, pode produzir hidroquinona com 99% de pureza.

Figura 6. Síntese da hidroquinona por hidroxilação do fenol (KIRK-OTHMER, 1998), (ULLMANN'S, 1999).

• Oxidação da anilina

A oxidação da anilina é o processo mais antigo usado para a produção de hidroquinona. A anilina é oxidada com dióxido de manganês (15 – 20% de excesso) em ácido sulfúrico mantido em temperatura de 0 – 15° C (Figura 7). Esta reação produz p-benzoquinona, que é removida da mistura por destilação. O subproduto sulfato de manganês pode ser comercializado em aplicações agrícolas. A hidroquinona é obtida da p-benzoquinona, mediante redução com ferro a 55 – 65° C ou por catálise com hidrogênio. O produto geralmente grau técnico, é cristalizado e isolado do fluido aquoso por centrifugação e secado a vácuo. O rendimento desta síntese é aproximadamente 85%.

Figura 7. Síntese da hidroquinona mediante a oxidação da anilina (KIRK-OTHMER, 1998), (ULLMANN'S, 1999).

Quadro 1. Especificações de qualidade da hidroquinona (KIRK-OTHMER, 1998), (ULLMANN'S, 1999), (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

Ensaio	Grau farmacêutico	Grau técnico
Solubilidade	Água, álcool, clorofórmio	Água, álcool, clorofórmio
Faixa de fusão	172 – 174° C	169° C
Teor de água	Máximo 0,5%	Máximo 1,0%
Doseamento	99,0 – 100,5%	99,0%

2.5 Melanina

Por muito tempo a proteção da pele contra radiações actínicas tem sido atribuída à melanina, constituindo o primeiro sistema de auto-defesa do organismo através da pigmentação da pele. Os grânulos de melanina que se formam nos melanócitos na parte basal das células da pele, por meio de radiações ultravioleta B (UVB), são removidos da superfície do estrato córneo, onde são oxidados pelas radiações ultravioleta A (UVA). Quando a pele é exposta à luz do sol, ou à radiação UV de qualquer fonte, podem ocorrer nela várias reações que aumentam a transferência de melanina para os queratinócitos. A radiação UV faz mais que aumentar a quantidade de melanócitos detectáveis na pele, de forma que a radiação UV aumenta a taxa de transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos. Pode-se afirmar que as mais importantes funções da melanina são a proteção contra as queimaduras do sol, afecções actínicas e prevenção do câncer de pele, tendo também como importância, a termo-regulação e regulação da síntese de vitamina D (CASTRO, e col., 1997).

As melaninas estão constituídas por biopolímeros heterogêneos produzidos por células especializadas, chamadas melanócitos, encontrados na pele no bulbo folicular e nos olhos. Elas são sintetizadas pela melanogênese e responsáveis pela pigmentação da pele, do cabelo e dos olhos (CASTRO, e

col., 1997). As desordens da hiperpigmentação são causadas pela abundante produção de melanina, seja por um número aumentado ou normal de melanócitos, ou por desordens hormonais (CECIL, et al., 1993), (SILVA e RESENDE, 1998).

A hidroquinona é uma substância despigmentante de referência (BALIÑA, e col., 1991), (KAKITA and LOWE, 1998), que pertence ao grupo dos fenóis, possui um grupo hidroxila em posição para, sendo por isto que sofre oxidação facilmente, esta reação é muito sensível à presença de íons metálicos, altas concentrações de oxigênio, pH elevado e luz (SU, 1998). Para melhorar a estabilidade físico-química da hidroquinona alguns pesquisadores têm adicionado às formulações, ciclodextrinas (FERIOLI, et al., 2001), (MAIBACH and OLDMAN, 1999).

2.6 Atividade farmacológica da hidroquinona

A hidroquinona produz despigmentação reversível da pele inibindo a oxidação enzimática da tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (impede a transformação da tirosina em DOPA, precursor da melanina) e inibição substancial de outros processos metabólicos dos melanócitos. Como interfere na formação de melanina, a despigmentação não é imediata e é reversível quando o fármaco é suspenso (BLEEHEN, 1977), (HARDMAN, et al., 1996), (SILVA e RESENDE, 1998), (ZANINI e OGA, 1989).

- **Aplicações terapêuticas**

A hidroquinona tem sido eficaz contra as seguintes desordens da hiperpigmentação da pele:

As sardas ou efélides são máculas de coloração castanho-claro-avermelhadas encontradas em áreas expostas ao sol e causadas pelo aumento na produção de melanina em um número normal de melanócitos.

Ocorrem em indivíduos de tez clara com cabelos ruivos em tons louro. A radiação ultravioleta aumenta a produção de melanina nessas lesões (CECIL, et al., 1993), (GLADSTONE, et al., 2000), (MOHAMED and MOHAMED, 1998).

Os lântigos são também máculas hiperpigmentadas, mas ocorrem em virtude de um número aumentado de melanócitos na camada basal da epiderme. Dois tipos são reconhecidos, 1) lântigo simples, que surge precocemente na vida e é congênito, e 2) lântigos actínicos, que são adquiridos na meia-idade e estão relacionados com o dano solar sobre a face, os braços e o dorso das mãos. Os lântigos actínicos são às vezes difíceis de serem diferenciados dos lântigos malignos iniciais na face, mas não têm potencial maligno (CECIL, et al., 1993), (SPENCER and BECKER, 1963).

O melasma afeta geralmente a face das mulheres, e nesse caso os melanócitos produzem mais melanina que o normal em resposta a fatores hormonais (ocorre durante a gestação ou do uso de pílulas anticoncepcionais), exposição à luz solar e por predisposição genética. Esse tipo de pigmentação manifesta-se de modo simétrico sobre as eminências malares, a testa e o lábio superior. As lesões podem esmaecer com o parto, mas com frequência persistem e se acentuam com o uso de pílulas anticoncepcionais (CECIL, et al., 1993), (GUEVARA and PANDYA, 2001), (KATSAMBAS and ANTONIOU, 1995), (LIMA, et al., 2003), (MOHAMED and MOHAMED, 1998).

A hidroquinona também é eficaz para clarear áreas do corpo mais específicas (YOSHIMURA, et al., 2002).

- **Mecanismo de Ação**

Pode resultar de uma variedade de ações sobre os melanócitos. A hidroquinona pode exercer sua ação seletiva em qualquer parte da via metabólica pela qual a melanina é sintetizada ou sobre o produto final. Acredita-se que a hidroquinona pode afetar, não somente a formação, melanização e degradação dos melanossomas, mas também a membrana

destas organelas e, eventualmente, causar a necrose de toda a célula, eliminando assim a hiperpigmentação (JIMBOW, et al., 1974).

A hidroquinona pode atuar não como inibidora da tirosinase, mas como um substrato alternativo da enzima, competindo com a tirosina por esta enzima. Estudos comprovaram que o efeito inibitório da hidroquinona na melanogênese seria o resultado de uma competição eficaz da mesma com a tirosina pela enzima tirosinase. A tirosinase oxida a hidroquinona, produzindo quinonas citotóxicas dentro dos melanócitos, as quais rompem o processo celular normal, causando degradação dos melanossomas. Assim, a hidroquinona, independente de sua concentração, vai atuar da mesma maneira, ou seja, produzindo quinonas citotóxicas, as quais causam degradação dos melanossomas, os grânulos contidos nos melanócitos, responsáveis pela produção de melanina. Também acredita-se que inibe a síntese de DNA e RNA (BRIGANTI, et al., 2003), (HEMSWORTH, 1973), (KATSAMBAS and STRATIGOS, 2001), (PALUMBO, et al., 1991), (PENNEY, et al., 1984).

Figura 8. Mecanismo de inibição da melanogênese por hidroquinona (PALUMBO, et al., 1991), (PROTA, 1996).

- **Metabolismo**

A hidroquinona é absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal e é eliminada na urina como conjugado de sulfato e glucuronato; estes processos se realizam no fígado. Estudos realizados em animais de laboratórios têm demonstrado que quando a hidroquinona é administrada por via oral pode ser excretada no ar expirado 0,4%; urina 91,9% e nas fezes 3,8%. Na urina excretada, 25 a 42% está sob a forma de monosulfato e 56 a 66% sob a forma de monoglucuronato (DIVINCENZO, et al., 1984).

A exposição da derme ao creme de hidroquinona (emulsões óleo em água) em concentrações de 0,; 2,0; 3,5 ou 5% durante 13 semanas (administrado 5 dias por semana), não produz toxicidade sistêmica além de não serem observadas lesões renais, as quais são observadas após administração oral de hidroquinona (BARBER, et al., 1995), (MAIBACH and OLDMAN, 1999).

- **Contra-indicações**

Deve-se evitar o uso de formulações de hidroquinona durante o dia, regiões perioculares, crianças menores de 12 anos e é contra-indicada quando houver sensibilidade (KOROLKOVAS, 2002), (PEREIRA, 1993).

- **Reações adversas**

A ocronose exógena, é uma das reações adversas da hidroquinona, mas só é observada em pessoas negras. Esta reação foi observada na África do Sul, pelo consumo de produtos que apresentavam concentrações de hidroquinona de 6 a 8% (GIUDICE and YVES, 2002), (MEDINSKY, et al., 1995), (SU, 1998). Um efeito raro é a despigmentação das unhas depois de aplicações de cremes de hidroquinona por vários meses (OZLUER and MUIR, 2000), ou desenvolvimento de acne facial (GIUDICE and YVES, 2002).

Alguns pacientes podem manifestar sensação de queimadura, com surgimento de eritemas e inflamação. Nestes casos, a formulação pode ser suspensão e o creme de hidrocortisona pode ser administrado com alívio da reação. A exposição à radiação ultravioleta causa repigmentação, de modo que a hidroquinona é freqüentemente associada com um filtro solar de amplo espectro (MARTINDALE, 2002).

- **Toxicologia**

A hidroquinona é uma substância química empregada para vários propósitos, entre eles, como revelador fotográfico, inibidor de polimerização, antioxidante [não usado na atualidade em alimentos (O'DONOGHUE, et al., 1999)] e agente despigmentante. A exposição à hidroquinona em humanos consiste primariamente por inalação e contato dermal, durante o processo de fabricação ou pelo uso inadequado dos produtos despigmentantes (DE CAPRIO, 1999).

A inalação de partículas de hidroquinona ou ingestão deliberada provoca transtornos no sistema nervoso central e outros efeitos tais como tremor, dificuldade respiratória, onde até convulsões têm sido descritas (DE CAPRIO, 1999), (ELLENHORN, et al., 1997).

2.7 Espectrofotometria derivada

A espectrofotometria no ultravioleta é um método óptico de análise de medicamentos que se baseia na medida de absorção de um sistema líquido quando um feixe de luz branca passa através dele. A perda da radiação é devida em parte, às reflexões nas superfícies e em parte à dispersão por qualquer partícula em solução, mas acima de tudo, é devida à absorção da energia radiante pelo líquido (MOFFAT, et al., 1986), (EWING, 1972).

Quando se tem uma mistura de princípios ativos ou mesmo um só em uma matriz complexa, a espectrofotometria direta muitas vezes não pode caracterizá-los, devido à sobreposição das bandas, impedindo assim a absorção verdadeira do componente de interesse.

A espectrofotometria derivada é uma operação matemática de grande utilidade para análises qualitativas e quantitativas, já que algumas vezes pode melhorar a informação de bandas mal resolvidas devido aos interferentes ou misturas. Para duas bandas A e B de igual absorbância, mas de diferente largura, a amplitude derivada da banda aguda (ex. A), é maior que a larga (B) por um fator que aumenta com o aumento da ordem da derivada. Por isso, o uso de espectros derivados pode aumentar a sensibilidade de detecção de características difíceis de observar na espectrofotometria direta (SANCHEZ, et al., 1988).

Para análise quantitativa a lei de Lambert-Beer é obedecida pela seguinte equação:

$$\frac{d^n A}{d \lambda^n} = \frac{d^n \epsilon}{d \lambda^n} l c$$

onde A = absorbância, ϵ = absortividade molar ($\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l = comprimento da célula (cm) e c = concentração do analito (mol l^{-1}). (HOPKALA and KOWALCZUK, 2000), (SANCHEZ, et al., 1988).

A primeira derivada se anula no ponto máximo do pico, é negativa onde a absorção decresce e é positiva onde a absorção aumenta. O espectro obtido pela derivada segunda caracteriza-se por dois pontos de anulação, correspondentes ao máximo e mínimo da curva precedente, separados por um mínimo obtido pelo ponto de anulação do espectro da derivada primeira. A curva derivada de ordem n se anula n vezes, determinando n + 1 bandas, alternadamente positivas e negativas (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986).

Um inconveniente da técnica derivada, é que o sinal de ruído aumenta progressivamente com o aumento da ordem da derivada. O sinal de ruído de um espectro derivado depende da forma do espectro. Por exemplo, em uma banda gaussiana, se supomos que o sinal de ruído é 1 no espectro direto, no espectro derivado de primeira ordem o sinal de ruído está dado por $2,02/M$, no espectro de segunda ordem o sinal será $2,26/M^2$, no espectro de terceira ordem $8,10/M^3$, e no espectro de quarta ordem $17,8/M^4$, onde M é o número de pontos na largura total do pico ao meio do máximo (SANCHEZ, et al., 1988).

Para determinações quantitativas mediante a espectrofotometria derivada, supõe-se que o sinal obtido (amplitude) seja proporcional à concentração do componente a ser pesquisado, a comprovação é realizada através de várias técnicas escolhidas experimentalmente:

Método zero-pico: nesta técnica, mede-se o valor da derivada em qualquer comprimento de onda, exceto nos pontos de anulação. A sensibilidade da medida varia fortemente com o local onde é efetuada. Implícita nesta técnica, está o método chamado método do ponto de anulação (“zero-crossing”), onde o valor absoluto da amplitude da derivada de uma curva composta (absorção de mais de uma substância), em um determinado comprimento de onda, corresponde ao ponto de anulação da derivada do interferente. Este método é utilizado portanto, para eliminar erros sistemáticos provenientes de interferências específicas, mas é bastante sensível a pequenas alterações na posição da banda de interferente (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986).

Método pico-pico: neste método, mede-se a diferença das amplitudes, entre os valores das derivadas obtidas por um máximo e um mínimo contíguos. Esta técnica é susceptível às influências dos interferentes (HACKMANN, e col., 1991).

Método da tangente: para a aplicação deste método, traça-se uma linha tangencial a dois máximos ou mínimos contíguos e mede-se a distância desta linha a um mínimo ou máximo intermediário (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986).

Para a padronização de um método utilizando-se a espectrofotometria derivada, devem se levar em conta alguns parâmetros escolhidos experimentalmente:

Ordem da derivada: para a obtenção de bons resultados, deve-se escolher aquela que ofereça maior separação entre os picos, ou aquela que ofereça maior amplitude do máximo de absorbância (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986).

Delta lambda: é o incremento constante utilizado para traçar a curva derivada de um espectro de absorção. Sabe-se que utilizando valores altos de delta lambda a resolução da curva derivada diminui devido ao aumento do sinal-ruído, já que a razão entre o sinal emitido pelo aparelho e o ruído também é aumentada (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986).

Assentamento das ordenadas: este parâmetro está relacionado à largura das bandas de absorção no espectro direto, uma vez que a amplitude da curva derivada é inversamente proporcional a esta largura, ou seja, deve-se escolher aquela que proporcione maior amplitude (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986).

Existe um número muito grande de fármacos que têm sido quantificados pelo método da espectrofotometria derivada, por ser um método direto que não precisa de extrações prévias ou tratamentos de separação; é uma metodologia rápida, simples, exata e precisa (BOSCH, et al., 1995), (HACKMANN, e col., 1991), (LEVILLAIN and FOMPEYDIE, 1986), (SANCHEZ, et al., 1988).

2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase fixa de grande área superficial denominada fase estacionária, e a outra um fluido que percorre através dela, sendo por isto, denominada fase móvel (COLLINS, e col., 1997).

A descoberta da cromatografia como uma técnica analítica é geralmente atribuída ao botânico russo M. Tswett, o qual conseguiu separar pigmentos de cloroplastos contidos em folhas verdes de plantas utilizando um tubo de vidro preenchido com carbonato de cálcio. Ele foi o primeiro a compreender e interpretar o processo cromatográfico como hoje é aceito, empregando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna de vidro (MORHY, 1976).

- **Classificação da cromatografia**

Os métodos cromatográficos podem ser classificados pelas formas físicas, pelo processo de separação e pela fase móvel.

Formas físicas: esta baseada no meio físico no qual a fase estacionária e móvel entram em contato. A fase estacionária pode ser colocada em um tubo cilíndrico ou disposta sobre uma superfície planar. Nesta classificação, a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. Na primeira, de acordo com o tamanho do diâmetro interno do tubo, temos as colunas preparativas (6 – 50 mm), analíticas (2 – 6 mm) e com microdiâmetro (< 2 mm) (COLLINS, e col., 1997).

Processo de separação: estes podem ser físicos, químicos ou mecânicos. Os físicos são de adsorção ou partição, baseando-se principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares, incluindo a formação de pontes de hidrogênio. Quando se trata da sílica ou alumina como fase estacionária, a

adsorção do soluto ocorre na interface entre as partículas sólidas e a fase móvel, devido à presença de grupos ativos nas suas superfícies; a dessorção do soluto implica a volta deste à fase móvel. O processo é interfacial quando a fase estacionária é um líquido espalhado na superfície de um suporte sólido ou nas paredes de um tubo cromatográfico, este fenômeno chama-se partição e baseia-se nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária. A volta dos componentes à fase móvel depende da sua volatilidade (fase móvel gasosa) ou de sua solubilidade (fase móvel líquida). No processo químico de troca iônica, a fase estacionária é constituída de uma matriz onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis, desta maneira são obtidos os trocadores aniônicos que têm sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, que têm sítios carregados negativamente e retêm cátions. A fase móvel é geralmente uma solução iônica com propriedades tamponantes, escolhida de forma a ser compatível com o tipo de trocador usado, assim, se a fase estacionária retém cátions, a fase móvel deve conter cátions capazes de substituí-los preferencialmente (COLLINS, e col., 1997).

Fase móvel: levando em consideração o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia em fase gasosa, onde a fase móvel é um gás, a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido, e a cromatografia em fluido supercrítico, onde se usa como fase móvel um vapor pressurizado, em temperatura acima de sua temperatura crítica (COLLINS, e col., 1997).

- **Métodos para descrever a eficiência da coluna**

A eficiência da coluna é medida a partir dos pratos teóricos, os quais correspondem a uma etapa de equilíbrio do soluto entre as duas fases. Esta medida se faz através dos tempos de retenção obtidos e do alargamento das bandas. Este parâmetro é normalmente utilizado para avaliar o desempenho da coluna, sendo:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_{0,5}} \right)^2$$

Onde N é o número de pratos teóricos, t_r é o tempo de retenção, w_b o alargamento da banda e $w_{0,5}$ o alargamento da banda à meia altura (CIOLA, 2000).

A altura equivalente a um prato teórico, é a correlação entre o número de pratos teóricos e o tamanho da coluna, este parâmetro é utilizado para a comparação da eficiência entre colunas de diferentes tamanhos.

$$H = \frac{L}{N}$$

Onde L é a comprimento da coluna (CIOLA, 2000).

• Resolução

A resolução de uma coluna fornece uma medida quantitativa da sua habilidade em separar dois ou mais analitos, quanto maior for o valor, melhor será a separação dos analitos.

$$R = \frac{2 (t_{rb} - t_{ra})}{w_a + w_b}$$

Onde R é a resolução, t_{rb} e t_{ra} , são os tempos de retenção dos analitos, sendo t_{rb} o analito que fica mais retido na coluna, e w_a e w_b , as larguras dos picos (SKOOG, e col., 2002).

2.9 Métodos de análise de hidroquinona em produtos cosméticos

A hidroquinona tem sido a substância de maior uso em preparações cosméticas e medicamentos, considerada como a mais eficaz para produzir despigmentação da pele (SPENCER, 1961). O uso de hidroquinona em cremes e géis não provoca reações adversas, porém concentrações elevadas podem causar sensibilização e outros efeitos colaterais (GIUDICE and YVES, 2002), (MARTINDALE, 2002), (SU, 1998). Considerando-se a segurança do consumidor e o controle de qualidade dos produtos comercializados no mercado, é necessário estabelecer métodos analíticos para a determinação da hidroquinona em diversas formas farmacêuticas.

Os métodos oficiais para a determinação quantitativa da hidroquinona em formulações farmacêuticas são descritos em farmacopéias ou órgãos regulamentadores, entre eles estão a Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED States Pharmacopeia, 2002) e a Comunidade Europeia que possui um protocolo para a determinação da hidroquinona em formulações farmacêuticas (Sixth Directive 95/32 EC of the Commission, 1995).

A determinação da hidroquinona em cremes cosméticos teve seu início com os pesquisadores POPOV e YANISHLIEVA (POPOV and YANISHLIEVA, 1970), que fizeram as determinações mediante extrações da hidroquinona com ácido acético, logo depois a converteram a p-benzoquinona com subsequente determinação espectrofotométrica a 460 nm.

Têm sido desenvolvidas várias metodologias analíticas para a quantificação de hidroquinona em formulações farmacêuticas. FIRTH e RIX (FIRTH and RIX, 1986) determinaram o teor de hidroquinona em cremes mediante cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizaram uma coluna Spherisorb® S5-ODS 5 µm, 250 mm x 4,6 mm, detecção UV a 226 nm (arranjo de diodos), fase móvel constituída por metanol:água (10:90 v/v), vazão de 1,5 mL/min., tendo um tempo de retenção para a hidroquinona de aproximadamente 5 minutos.

GAGLIARDI e colaboradores (GAGLIARDI, et al., 1987), descreveram uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para a identificação e quantificação de hidroquinona e alguns de seus éteres em produtos cosméticos. Nesta metodologia usou-se uma coluna cromatográfica Erbacil® C₁₈ 5 µm, 150 mm x 4,6 mm, operada a 30° C, detecção UV a 294 nm, fase móvel constituída por acetonitrila:água (5:95 v/v) por 5 minutos, depois um gradiente linear até 50% de acetonitrila em 15 minutos, vazão de 1,8 mL/min. Desta maneira consegue-se uma separação de cinco éteres de hidroquinona, usou-se 2-fenilfenol como padrão interno.

BORREMANS e colaboradores (BORREMANS, et al., 1999), validaram um método por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidroquinona e três de seus éteres. Usaram uma coluna Bondapak Phenyl®, 300 mm x 3,9 mm, detecção UV a 295 nm, fase móvel constituída por tetrahidrofurano:água (45:55 v/v), vazão de 1,0 mL/min.

SHARMA e colaboradores (SHARMA, et al., 1998) desenvolveram um sistema em cromatografia em camada delgada, embora não tenham aplicado o método a produtos cosméticos, a pesquisa proporciona diversos valores de R_f em diferentes sistemas de fase móvel e reveladores.

Foram também desenvolvidas técnicas eletroforéticas para a determinação de hidroquinona em produtos cosméticos. SAKODINSKAYA e colaboradores (SAKODINSKAYA, et al., 1992) e Lunn (LUNN, 2000), determinaram o teor de hidroquinona e alguns de seus éteres em cremes cosméticos, utilizando a cromatografia capilar eletrocinética micelar; esta é uma técnica eletroforética na qual a separação é feita com o mesmo equipamento utilizado para a eletroforese de zona. Para a separação, usou-se um tubo capilar de sílica fundida de 50 cm x 75 µm a 38 cm do detector, detecção UV a 254 nm, injeção hidrodinâmica (6 segundos a 10 cm de altura), com voltagem constante, eletrólito constituído por tampão de borato 0,01 M (pH 9,5) + 0,075 M de dodecil sulfato de sódio com 10% metanol (v/v).

DESIDERIO e colaboradores (DESIDERIO, et al., 2000), validaram uma metodologia para a determinação de hidroquinona e alguns de seus éteres em cremes cosméticos usando a eletrocromatografia capilar. Utilizaram como coluna de separação, um tubo capilar de sílica fundida de 30 cm x 100 µm a 21,5 cm do detector, detecção UV a 205 nm (arranjo de diodos), injeção a 12 bar x 30 segundos, com 25 Kv, fase móvel constituída por acetato de amônia 20 mM pH 6:acetonitrila (30:70 v/v).

Outras técnicas têm sido utilizadas para a determinação de hidroquinona em preparações cosméticas, proporcionando resultados satisfatórios. RUEDA e colaboradores (RUEDA, et al., 2003), otimizaram um sistema de injeção em fluxo com detecção eletroquímica. Usou-se uma solução carreadora constituída por tampão pH 4,8 ácido acético/acetato:metanol (85:15 v/v).

CRUZ e FATIBELLO-FILHO (CRUZ and FATIBELLO-FILHO, 2000), determinaram o teor de hidroquinona em cremes cosméticos utilizando um biosensor modificado com tecido de batata em fase orgânica. O biosensor de fase orgânica foi depositado sobre “paraffin/grafito” modificado com tecido de batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) como fonte de peroxidase. Esta enzima em presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação de hidroquinona a p-quinona, a qual se reduz eletroquimicamente a hidroquinona com diferencial de potencial de -0,22 V. O limite de detecção foi de $8,1 \times 10^{-6}$ M.

WANG (WANG, 1995) utilizou uma técnica eletroanalítica para a determinação de hidroquinona e alguns de seus éteres. Tanto a hidroquinona como seus éteres, podem ser pré-concentrados na superfície de um eletrodo antes de sua determinação voltamétrica. A determinação foi feita em tampão de fosfato 0,1 mol/L (pH 2,1), tendo os picos a +0,220 V para hidroquinona, +0,448 V e +0,780 V para monobenzil éter de hidroquinona e dimetil éter de hidroquinona respectivamente.

2.10 Métodos de análise de hidroquinona em fluidos biológicos

GREENLEE e colaboradores (GREENLEE, et al., 1981), desenvolveram um método para a determinação de hidroquinona e outros derivados do benzeno. Utilizaram uma coluna cromatográfica C-18, detecção UV a 280 nm, vazão de 1,5 mL/min., fase móvel constituída por metanol:água usando um gradiente linear em 15 minutos de 10 a 90% de metanol aquoso. O método foi aplicado a extratos de fígado e medula espinhal de ratos.

LEE e colaboradores (LEE, et al., 1993), realizaram a determinação simultânea de hidroquinona, catecol e fenol em urina mediante cromatografia líquida de alta eficiência. A separação foi feita em uma coluna Partisphere 5[®] C-18 (110 mm x 4,7 mm x 5 µm), detecção fluorométrica, fases móveis constituídas por sistema de tampões: tampão A, acetato de sódio 10 mM:ácido acético (99,5:0,5 v/v) pH 3,4 e tampão B, acetato de sódio 10 mM:acetonitrila (80:20 v/v) pH 3,8. O método foi aplicado a trabalhadores expostos a concentrações de benzeno e fumantes de cigarro.

WITTIG e colaboradores (WITTIG, et al., 2001), validaram uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidroquinona em urina. Sabe-se que extratos das folhas de “uva-ursi” [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel] são usadas na medicina natural para o tratamento de infecções do trato urinário. Dois metabólitos são descritos na literatura, hidroquinona glicuronida e sulfato de hidroquinona. Para a separação, usou-se uma coluna Aqua[®] C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), detecção coulométrica de 75 a 900 mV com incrementos de 75 mV, vazão de 0,8 mL/min., fase móvel constituída por duas soluções: A, solução aquosa de dihidrogenofosfato de sódio 0,02 M pH 3,4 e B, metanol:solução de dihidrogenofosfato de sódio 0,1 M pH 1,4 (4:1), utilizando um sistema de gradiente para a separação dos analitos. Os pesquisadores aplicaram o método a voluntários sadios antes e depois do consumo de extratos de “uva-ursi”.

GLÖCKL e colaboradores (GLÖCKL, et al., 2001), validaram duas metodologias em eletroforese capilar de zona, para a determinação de hidroquinona glicuronida e sulfato de hidroquinona. A hidroquinona glicuronida foi separada em um capilar de sílica fundida de 50 cm x 50 µm (45,4 cm ao detector), detecção UV a 200 nm, injeção por pressão (4 p.s.i. s.), voltagem de 25 kV, usou-se tampão de borato 400 mmol/L ajustado a pH 9,80 com hidróxido de sódio. O sulfato de hidroquinona foi separado em um capilar de sílica fundida de 50 cm x 50 µm (45,4 cm ao detector), detecção uV a 200 nm, injeção por pressão (4 p.s.i. s.), voltagem de 30 kV, utilizando tampão de borato 200 mmol/L ajustado a pH 9,35 com hidróxido de sódio. O método foi aplicado à urina de um voluntário após administração oral de um comprimido contendo extrato de “uva-ursi”.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O presente trabalho foi planejado para validar duas metodologias analíticas para a determinação de hidroquinona em formulações cosméticas e medicamentos bem como fazer testes de identificação da matéria-prima.

- Caracterizar a hidroquinona matéria-prima, mediante técnicas espectrométricas, cromatográficas e físico-químicas.
- Validar duas metodologias analíticas para a determinação de hidroquinona em formulações cosméticas e medicamentos.
- Aplicar os métodos validados em amostras industrializadas e manipuladas.
- Preparar a monografia da hidroquinona para a Farmacopéia Brasileira 4^a edição.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Solventes e soluções

- Ácido sulfúrico 96 - 98 % grau analítico (Merck®)
- Solução de ácido sulfúrico 0,1 N
- Solução de sulfato cérico 0,1 N (Merck®)
- Clorofórmio grau analítico (Merck®)
- Metanol grau analítico (Merck®)
- Metanol grau cromatográfico (Merck®)
- Água MilliQ Plus®
- Água destilada

4.1.2 Substância empregada como padrão

- Hidroquinona sem ulterior purificação, cedido por:
Laboratórios Stiefel S. A., São Paulo, Brasil (pureza 99.8 %)

4.1.3. Matérias-primas

Quadro 2. Matérias-primas utilizadas nas formulações manipuladas e seus respectivos fornecedores.

Matéria-prima	Fornecedor
Álcool cetosteárilico sulfatado	Galena
EDTA	Natural-Pharma
Hidroxietilcelulose	Natural-Pharma
Metabissulfito de sódio	Natural-Pharma
Metilparabeno	Natural-Pharma
Mistura de parabenos (butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno e propilparabeno) com fenoxietanol	Natural-Pharma
Oleato de etila	Galena
Propilenoglicol	Galena
Propilparabeno	Uniphen
Vaselina líquida	Pharmaspecial
Vitamina C	Galena
Vitamina E	Pharmaspecial

4.1.4 Amostras

4.1.4.1 Placebos (bases)

Gel base	% p/p
○ Hidroxietilcelulose	2%
○ Mistura de parabenos com fenoxietanol	0,2%
○ Água destilada	q.s.p. 100g

Creme base	% p/p
○ Álcool cetosteárilico sulfatado	12,0%
○ Oleato de etila	5,0%
○ Vaselina líquida	5,0%
○ Metilparabeno	0,18%
○ Propilparabeno	0,02%
○ Água destilada	q.s.p. 100g

4.1.4.2 Solução de hidroquinona 20%

○ Hidroquinona	20%
○ Vitamina C	1%
○ Vitamina E	1%
○ Metabissulfito de sódio	10%
○ EDTA	0,5%
○ Propilenoglicol	q.s.p. 100 mL

4.1.4.3 Amostras manipuladas

- Amostra A (gel de hidroquinona 2%)

Gel base	98%
Hidroquinona	2%
- Amostra B (gel de hidroquinona 4%)

Gel Base	96%
Hidroquinona	4%
- Amostra I (creme de hidroquinona 2%)

Creme base	98%
Hidroquinona	2%

- Amostra II (creme de hidroquinona 4%)

Creme base 96%

Hidroquinona 4%

4.1.4.4 Amostras industrializadas

- Amostra C (gel de hidroquinona 2%)

Hidroquinona 2%

Excipientes 98%

- Amostra D (gel de hidroquinona 4%)

Hidroquinona 4%

Excipientes 96%

- Amostra III (creme de hidroquinona 4%)

Hidroquinona 4%

Excipientes 96%

4.1.5 Preparação das amostras manipuladas

4.1.5.1 Preparação dos placebos (bases)

- **Gel base**

Aquecer a água juntamente com o sistema de conservantes até aproximadamente 70° C, a seguir, adicionar a hidroxietilcelulose sob agitação.

- **Creme base**

Aquecer separadamente a fase oleosa e a fase aquosa a 70 – 75° C. Verter a fase aquosa sobre a fase oleosa com agitação.

4.1.5.2 Preparação dos géis

Preparar a quantidade necessária de gel base e adicionar sob constante agitação o volume preciso da solução de hidroquinona a 20% até homogeneização.

4.1.5.3 Preparação dos cremes

Preparar a quantidade necessária do creme base e adicionar sob constante agitação o volume preciso da solução de hidroquinona a 20% até homogeneização.

4.1.6 Equipamentos

- Espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo UV-1601, munido de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e acoplado a computador e impressora.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo CG[®] 480 C, com “loop” fixo de 20 µL; detector UV modelo CG[®] 435; integrador CG[®] modelo 200.
- Espectrofotômetro Infravermelho Bomem[®], modelo Michelson.
- Aparelho para determinação de ponto de fusão Stuart Scientific[®], modelo SMP1.
- Aparelho para determinação de água (Karl-Fischer) Metrohm[®], modelo 701 KF titrino 703 tistand.
- Mufla para calcinação Kyoritsu[®], modelo MR-3P.
- Estufa para dessecação Fanem[®], modelo 315 SE.
- Aparelho de ultra-som, Thornton[®], modelo T-14.
- Balança analítica Mettler Toledo[®], modelo AB 204.
- Aparelho MilliQ-plus, Millipore[®] para obtenção de água.
- Coluna cromatográfica LiChospher[®] 100 RP-18 (5µm) Merck[®].

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da matéria-prima

4.2.1.1 Identificação

4.2.1.1.1 Espectrometria no infravermelho

O espectro de absorção no infravermelho foi realizado mediante o preparo de uma dispersão de hidroquinona em brometo de potássio, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

4.2.1.1.2 Espectrofotometria no ultravioleta (UV)

Foi preparada uma solução 1:40000 em metanol e testada no UV em uma faixa de varredura entre 250 e 350 nm (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

4.2.1.1.3 Cromatografia em camada delgada

Foi preparada uma solução de hidroquinona em metanol contendo aproximadamente 1 mg/mL. Aplicaram-se 5 µL da solução sobre uma lâmina de vidro revestida com uma camada de 0,25 mm de sílica-gel cromatográfica. Após a secagem das manchas desenvolveu-se o cromatograma em um sistema de solvente constituído de volumes iguais de metanol e clorofórmio até que a frente do solvente tenha corrido cerca de três quartos da extensão da lâmina. Após secagem, os cromatogramas foram aquecidos até o aparecimento das manchas, determinando-se o R_f (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

4.2.1.2 Ensaio baseado em medida física

4.2.1.2.1 Faixa de fusão

Reduziu-se a amostra a pó fino e encheu-se um tubo capilar de vidro com uma das extremidades selada até cerca de 3,0 mm de altura. Colocou-se o tubo capilar no aparelho para a determinação do ponto de fusão e começou-se o aquecimento a uma temperatura de 5° C/min., quando a temperatura ficou 10° C abaixo do começo da fusão, reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1° C/min. A temperatura na qual a coluna da amostra funde sobre a parede do tubo em qualquer ponto, é definida como o início de fusão, e a temperatura na qual a amostra torna-se completamente líquida, é definida como o final de fusão ou o ponto de fusão. As duas temperaturas caem dentro dos limites da faixa de fusão (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996).

4.2.1.3 Ensaios de pureza

4.2.1.3.1 Perda por dessecação

Foi determinada com cerca de 1 g de hidroquinona previamente triturada e exatamente pesada. Tarou-se uma cápsula de porcelana previamente dessecada durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Colocou-se a amostra na cápsula de porcelana, e pesou-se exatamente seu conteúdo juntamente com a tampa. Por agitação lateral branda distribuiu-se a amostra o mais uniformemente possível. Colocou-se o recipiente de porcelana com a amostra na estufa removendo a tampa, mas deixando-a também na estufa, mantendo-se a amostra à temperatura de 105° C por 4 horas. Ao abrir a estufa, fechou-se a cápsula de porcelana imediatamente e deixou-se atingir a temperatura ambiente em dessecador antes da pesagem (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996).

4.2.1.3.2 Teor de água (método Karl-Fischer)

Reduziu-se a matéria-prima a pó fino, pesou-se cerca de 0,1550 g, e imediatamente transferiu-se para o frasco de titulação do aparelho e iniciando à titulação de forma automática. O volume gasto do reagente de Karl-Fischer é transformado em porcentagem de peso de água contida na amostra.

4.2.1.3.3 Resíduo pela incineração

1 g de hidroquinona exatamente pesada foi tratada com ácido sulfúrico 95% e incinerada a cerca de 800° C até peso constante (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996).

4.2.1.3.4 Doseamento

Dissolveu-se cerca de 250 mg de hidroquinona, previamente dessecados a 105° C por 3 horas e exatamente pesados, em mistura de 100 mL de água e 10 mL de ácido sulfúrico 0,1 N, adicionou-se 3 gotas de difenilamina SR, e titulou-se com sulfato cérico 0,1000 N até conseguir uma coloração vermelho-violeta no ponto final. Realizou-se o ensaio em branco para correção. Cada mL de sulfato cérico 0,1000 N equivale a 5,506 mg de $C_6H_6O_2$ (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977), (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

4.2.2 Análise das amostras manipuladas e industrializadas

4.2.2.1 Linearidade

4.2.2.1.1 Parâmetros estabelecidos

Solvente:	ácido sulfúrico 0,1 N
Velocidade de varredura:	370 nm/min
Assentamento das ordenadas:	0,00 – 1,00
Intervalo de varredura:	190 – 350 nm

4.2.2.1.2 Construção da curva de Ringbom

Para a construção da curva de Ringbom foram pesados exatamente cerca de 100,0 mg de hidroquinona padrão, e transferidas para balão volumétrico de 100 mL adicionando uma quantidade de H_2SO_4 0,1 N para dissolução com o auxílio de ultra-som por um minuto, em seguida, completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se uma solução com concentração de 1000,0 $\mu\text{g/mL}$. A seguir, transferiram-se 25,0 mL desta primeira solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com H_2SO_4 0,1 N. Desta última solução transferiram-se 25,0 mL para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com H_2SO_4 0,1 N, obtendo-se uma solução de concentração analítica de 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de hidroquinona.

Da última solução foram transferidas 20 alíquotas cujos volumes variavam entre 1,0 a 20,0 mL para balões volumétricos de 25 mL, os volumes destes balões foram completados com H_2SO_4 0,1 N, obtendo-se assim soluções com intervalo de concentração entre 2,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$ de hidroquinona.

As leituras das absorbâncias foram efetuadas a 289,0 nm, após o aparelho ter sido calibrado com H_2SO_4 0,1 N utilizado como branco. A partir dos resultados obtidos construiu-se a curva de Ringbom.

4.2.2.1.3 Construção da curva de calibração

Foram utilizadas para a construção da curva de calibração as leituras das absorbâncias determinadas no intervalo de concentração entre 10,0 a 26,0 µg/mL de hidroquinona, faixa de concentração onde a lei de Lambert-Beer é obedecida. Calcularam-se o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação através do método dos mínimos quadrados.

4.2.2.2 Pesquisa de interferentes

Realizou-se analisando soluções preparadas a partir das amostras placebo (gel base e creme base), obtendo-se concentrações equivalentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/ml de hidroquinona. Foi pesado do gel e do creme, o equivalente a 20,0 mg de hidroquinona em um becker de 100 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 50 mL de H₂SO₄ 0,1 N e agitou-se por 10 minutos em banho-maria a 40° C. Após quebra da emulsão transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 5 mL do filtrado. Transferiram-se alíquotas de 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL para balões volumétricos de 50 mL. As concentrações analíticas foram de 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL de solução de gel e creme base.

Após homogeneização das soluções preparadas e calibração do aparelho com H₂SO₄ 0,1 N como branco, determinaram-se os espectros de absorção no ultravioleta na faixa de 190 a 350 nm.

4.2.2.3 Método espectrofotométrico derivado no UV

4.2.2.3.1 Parâmetros estabelecidos

Solvente:	ácido sulfúrico 0,1 N
Ordem da derivada:	1ª ordem
Delta lambda ($\Delta\lambda$):	2 nm
Velocidade de varredura:	370 nm/min
Assentamento das ordenadas:	+0,5 a -1,0
Intervalo de varredura:	190 – 350 nm
Concentração analítica:	10,0 µg/mL a 26,0 µg/mL
Método de quantificação:	método zero-pico

4.2.2.3.2 Construção da curva de calibração

Foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de hidroquinona e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se quantidade suficiente de H_2SO_4 0,1 N até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. A seguir transferiram-se 5,0 mL desta primeira solução para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com H_2SO_4 0,1 N. Desta ultima solução, foram transferidas 5 alíquotas, cujos volumes variavam entre 2,5 e 6,5 mL para balões volumétricos de 25 mL. Os volumes destes balões foram completados com H_2SO_4 0,1 N, obtendo-se assim, soluções com intervalo de concentração variável entre 10,0 e 26,0 µg/mL de hidroquinona. Após o aparelho ter sido calibrado com solução de H_2SO_4 0,1 N, realizou-se a varredura das soluções no intervalo de 190 a 350 nm. A partir destes espectros traçaram-se as derivadas de 1ª ordem, sendo feitas as leituras a 302,0 nm.

Determinaram-se o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação da curva, os cálculos foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.2.3.3 Pesquisa de interferentes

Procedeu-se ao preparo das soluções do gel e creme base em concentrações correspondentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL de hidroquinona conforme o ensaio realizado na espectrofotometria direta. Determinaram-se os espectros de absorção das soluções, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem e fizeram-se as leituras a 302,0 nm.

4.2.2.3.4 Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas

- **Preparação da solução padrão**

Foi utilizado como padrão a média aritmética das leituras de três soluções com concentração de 18,0 µg/mL de hidroquinona. Pesaram-se exatamente cerca de 45,0 mg de hidroquinona e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de H₂SO₄ 0,1 N até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. A seguir transferiu-se (em triplicata) 1,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com H₂SO₄ 0,1 N. Após o aparelho ter sido calibrado com solução de H₂SO₄ 0,1 N, realizou-se a varredura das soluções no intervalo de 190 a 350 nm, a partir destes espectros traçaram-se as derivadas de 1ª ordem, sendo feitas as leituras a 302,0 nm.

- **Preparação da solução das amostras**

Foi pesado do gel e do creme, o equivalente a 15,0 mg de hidroquinona em um becker de 100 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 50 mL de H₂SO₄ 0,1 N e agitou-se por 10 minutos em banho-maria a 40° C. Após quebra da emulsão transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente obtendo-se uma solução de concentração de 150,0 µg/mL. A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros

5 mL do filtrado. Transferiram-se alíquotas de 3,0 mL para balões volumétricos de 25 mL. A concentração analítica foi de 18,0 µg/mL de hidroquinona.

Após homogeneização das soluções preparadas e calibração do aparelho com H₂SO₄ 0,1 N, determinaram-se os espectros de absorção das soluções, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem e fizeram-se as leituras a 302,0 nm. Foram realizadas dez determinações e os resultados analisados estatisticamente.

4.2.2.3.5 Teste de recuperação

- **Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 60,0 mg de hidroquinona e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se quantidade suficiente de H₂SO₄ 0,1 N até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. Transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com H₂SO₄ 0,1 N. A concentração final obtida foi de 120,0 µg/mL de hidroquinona.

- **Preparação da solução das amostras.**

Foi pesado do gel e creme, o equivalente a 12,0 mg de hidroquinona em um becker de 100 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 50 mL de H₂SO₄ 0,1 N e agitou-se por 10 minutos em banho-maria a 40° C. Após quebra da emulsão transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente obtendo-se uma solução de concentração de 120,0 µg/mL. A solução foi filtrada rejeitando-se os primeiros 5 mL.

Alíquotas das soluções das amostras e padrão foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume com H₂SO₄ 0,1 N conforme o esquema a seguir:

Balão	Solução padrão 120,0 µg/mL (mL)	Solução amostra 120,0 µg/mL (mL)
1	10,0	---
2	---	10,0
3	1,0	10,0
4	5,0	10,0
5	10,0	10,0

Determinaram-se os espectros de absorção das soluções, traçaram-se as derivadas de 1ª ordem e fizeram-se as leituras a 302,0 nm.

4.2.2.3.6 Determinação do limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando-se soluções padrão de baixa concentração, considerando a capacidade do método para detectar e quantificar baixas concentrações de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas.

Foram preparadas soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 µg/mL de hidroquinona, e efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos. O cálculo para o LD e LQ foi realizado segundo as fórmulas (SWARTZ e KRULL, 1998):

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10$$

4.2.2.4 Método cromatográfico

4.2.2.4.1 Parâmetros estabelecidos

Fase móvel: metanol:água (20:80 v/v)
Vazão: 1,0 mL/min
Detecção: UV a 289,0 nm.
Coluna: LiChrospher[®] RP-18 (5 µm) Merck[®]
Volume de injeção: 20 µL
Vel. do papel: 5 mm/min.

4.2.2.4.2 Construção da curva de calibração

Foram pesados exatamente cerca de 30,0 mg de hidroquinona e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. A seguir transferiu-se 1,0 mL desta primeira solução para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel. Desta última solução, foram transferidas 5 alíquotas, cujos volumes variavam entre 0,5 e 2,5 mL para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes destes balões foram completados com fase móvel, obtendo-se assim, soluções com intervalo de concentração variável entre 6,0 e 30,0 µg/mL de hidroquinona.

Determinaram-se o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação da curva, os cálculos foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados.

4.2.2.4.3 Pesquisa de interferentes

Foi pesado do gel e creme base, o equivalente a 4,5 mg de hidroquinona em um becker de 30 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 15 mL de fase móvel e agitou-se por 10 minutos. Após quebra da emulsão transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com o

mesmo solvente. Transferiram-se alíquotas de 1,0 mL para balões volumétricos de 10 mL. A concentração analítica foi correspondente a 18,0 µg/mL de hidroquinona. Antes de iniciar as injeções no cromatógrafo, cada solução foi filtrada em unidades filtrantes HATF Millipore® 0,45 µm.

4.2.2.4.4 Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas

- **Preparação da solução padrão**

Foi utilizado como padrão a média aritmética das leituras de três soluções com concentração de 18,0 µg/mL de hidroquinona. Pesaram-se exatamente cerca de 15,0 mg de hidroquinona e transferiram-se para balão volumétrico de 25 mL, adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até dissolução e completou-se com o mesmo solvente. A seguir transferiu-se 3,0 mL desta primeira solução para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel. Desta última solução, foram transferidos 1,0 mL (em triplicata) para balão volumétrico de 10 mL.

- **Preparação de soluções amostras**

Foi pesado do gel e do creme, o equivalente a 4,5 mg de hidroquinona em um becker de 30 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 15 mL de fase móvel e agitou-se por 10 minutos. Após quebra da emulsão transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. Transferiram-se alíquotas de 1,0 mL para balões volumétricos de 10 mL. A concentração analítica foi de 18,0 µg/mL de hidroquinona. Antes de iniciar as injeções no cromatógrafo, cada solução foi filtrada em unidades filtrantes HATF Millipore® 0,45 µm. Foram realizadas dez determinações e os resultados analisados estatisticamente.

4.2.2.4.5 Teste de recuperação

- **Preparação da solução padrão**

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de hidroquinona e transferidas para balão volumétrico de 50 mL, dissolveu-se e completou-se o volume com a fase móvel. Uma alíquota de 1,0 mL da solução anterior foi transferida para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com a fase móvel, obtendo-se uma concentração final de 20,0 µg/mL.

- **Preparação da solução amostra**

Foi pesado do gel e do creme, o equivalente a 2,5 mg de hidroquinona em um becker de 30 mL de capacidade. Adicionou-se aproximadamente 15 mL de fase móvel e agitou-se por 10 minutos. Após quebra da emulsão transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. Obteve-se uma concentração analítica de 100,0 µg/mL de hidroquinona.

Alíquotas das soluções padrão e amostra foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com a fase móvel, conforme o esquema a seguir:

Balão	Solução padrão 20,0 µg/mL (mL)	Solução amostra 100,0 µg/mL (mL)
1	5,0	---
2	---	1,0
3	1,0	1,0
4	4,0	1,0
5	5,0	1,0

4.2.2.4.6 Determinação do limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados utilizando-se soluções padrão de baixa concentração, considerando a capacidade do método para detectar e quantificar baixas concentrações de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas.

Foram preparadas soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e 10,0 µg/mL de hidroquinona, foram efetuadas cinco leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão entre os resultados obtidos.

O cálculo para o LD e LQ foi realizado segundo as fórmulas (SWARTZ e KRULL, 1998):

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 3$$

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva de calibração}} \times 10$$

4.2.2.5 Comparação estatística dos métodos propostos

O teste F é um parâmetro estatístico que é usado para comparar os desvios padrões de dois grupos de dados, ou seja, os resultados de duas metodologias diferentes (MILLER, e col., 1993) (espectrofotometria derivada e cromatografia líquida de alta eficiência). O valor é calculado pela equação:

$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2}$$

Onde:

S_A^2 = maior desvio padrão

S_B^2 = menor desvio padrão

O desvio padrão maior sempre é colocado no numerador, fazendo que o valor de F sempre seja maior do que a unidade. A significância do valor obtido para F é então verificada por comparação com valores da tabela de F para um determinado nível de confiança (MILLER, e col., 1993). Se o valor encontrado para F excede o valor tabelado, considera-se que a diferença entre os resultados dos dois métodos é significativa, para um determinado nível de significância (CAULCUTT and BODDY, 1983), (MILLER, e col., 1993).

Outro teste de significância importante é o teste t , usado para verificar a significância de uma média ou da diferença entre duas médias dos valores experimentais obtidos por dois métodos diferentes para um determinado nível de significância.

Sejam $\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ as médias obtidas das análises de uma mesma amostra, através de dois métodos diferentes (espectrofotometria derivada e cromatografia líquida de alta eficiência). A variância baseada em ambas amostras é dada pela equação:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Onde:

S_1^2 = variância da amostra pelo método 1

S_2^2 = variância da amostra pelo método 2

n_1 = número de determinações pelo método 1

n_2 = número de determinações pelo método 2

O valor de t , é calculado pela equação:

$$t = s \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Onde:

$\bar{x}_1$ = média da amostra pelo método 1

$\bar{x}_2$ = média da amostra pelo método 2

S = é o desvio padrão, baseado em ambos métodos, obtido a partir da raiz quadrada da variância calculada para os mesmos.

t tem $(n_1 + n_2) - 2$ graus de liberdade.

Se o valor encontrado para t excede o valor tabelado, considera-se que a diferença entre os resultados dos dois métodos é significativa, para um determinado nível de significância (CAULCUTT and BODDY, 1983), (MILLER, e col., 1993).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Identificação

5.1.1 Espectro no infravermelho

Figura 9. Espectro de absorção no infravermelho da hidroquinona em pastilha de KBr.

Tabela 1. Bandas de absorção obtidas na determinação do espectro no infravermelho da hidroquinona em pastilha de KBr.

Comprimento de onda cm^{-1}	Banda de absorção
3193,24	ν , -OH
1515,94	ν , -C-C
1468,49	ν , -C-C
1208,59	δ , -OH
828,79	δ , -CH (p-aromático)
760,36	δ , -HC=CH

5.1.2 Espectro no ultravioleta

Figura 10. Espectro de absorção no ultravioleta da solução de hidroquinona (25 $\mu\text{g/mL}$) em metanol, pico máximo em 293,6 nm

5.1.3 Cromatograma em camada delgada

Figura 11. Placa cromatográfica de identificação da hidroquinona: solução de 1 mg/mL em metanol, volume aplicado 5 μ L. Fase móvel metanol:clorofórmio (1:1 v/v), fase estacionária sílica gel 60 Merck[®], Rf 0,87.

Tabela 2. Resultados obtidos na identificação da hidroquinona por cromatografia em camada delgada.

Determinação	Rf
A	0,87
B	0,89
C	0,88
Média	0,88

5.2 Ensaio de qualidade baseado em medidas físicas

5.2.1 Faixa de fusão

Tabela 3. Resultados obtidos na determinação da faixa de fusão.

Determinação	Faixa de fusão
A	171-177° C
B	171-177° C
C	171-177° C
Média	171-177° C

5.3 Ensaios de pureza

5.3.1 Perda por dessecação

Tabela 4. Resultados obtidos na determinação da perda por dessecação.

Determinação	Perda por dessecação
A	0,57%
B	0,54%
C	0,42%
Média	0,51%

5.3.2 Teor de água (método Karl-Fischer)

Tabela 5. Resultados obtidos na determinação do teor de água.

Determinação	Teor de água
A	0,37%
B	0,39%
C	0,36%
Média	0,37%

5.3.3 Resíduo pela incineração

Tabela 6. Resultados obtidos na determinação dos resíduos pela incineração.

Determinação	Resíduos pela incineração
A	0,20%
B	0,21%
C	0,22%
Média	0,21%

5.3.4 Doseamento

Tabela 7. Resultados obtidos na determinação do doseamento da hidroquinona.

Determinação	Doseamento
A	99,4%
B	100,4%
C	99,7%
Média	99,8%

5.4 Metodologia analítica

5.4.1 Método espectrofotométrico direto no UV

5.4.1.1 Construção da curva de Ringbom

Tabela 8. Resultados obtidos na determinação da curva de Ringbom. Hidroquinona em H_2SO_4 0,1 N; pelo método espectrofotométrico direto a 289,0 nm. Intervalo de concentração de 2,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$.

Balão	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Log concentração	Abs. 289,0 nm	%T	100 - %T
1	2,0	0,30	0.0477	89.60	10.40
2	4,0	0,60	0.1005	79.34	20.66
3	6,0	0,78	0.1493	70.91	29.09
4	8,0	0,90	0.1982	63.36	36.64
5	10,0	1,00	0.2494	56.31	43.69
6	12,0	1,08	0.2867	51.68	48.32
7	14,0	1,15	0.3346	46.28	53.72
8	16,0	1,20	0.3862	41.10	58.90
9	18,0	1,26	0.4379	36.48	63.52
10	20,0	1,30	0.4843	32.79	67.21
11	22,0	1,34	0.5450	28.51	71.49
12	24,0	1,38	0.5872	25.87	74.13
13	26,0	1,41	0.6367	23.08	76.92
14	28,0	1,45	0.6862	20.60	79.40
15	30,0	1,48	0.7247	18.85	81.15
16	32,0	1,50	0.7855	16.39	83.61
17	34,0	1,53	0.8367	14.56	85.44
18	36,0	1,56	0.8706	13.47	86.53
19	38,0	1,58	0.9122	12.24	87.76
20	40,0	1,60	0.9789	10.50	89.50

Figura 12. Espectros de absorção no ultravioleta da curva de Ringbom. Hidroquinona em H₂SO₄ 0,1 N; concentrações de 2,0 a 40,0 µg/mL.

Figura 13. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico direto no UV. Concentração das soluções de 2,0 a 40,0 µg/mL de hidroquinona em H₂SO₄ 0,1 N. Leituras efetuadas a 289,0 nm.

5.4.1.2 Construção da curva de calibração da hidroquinona em H_2SO_4 0,1 N a 289,0 nm. Tratamento estatístico

Tabela 9. Resultados obtidos na determinação da curva de calibração da hidroquinona em H_2SO_4 0,1 N; pelo método espectrofotométrico direto a 289,0 nm. Intervalo de concentração de 10,0 a 26,0 $\mu\text{g/mL}$.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Absorbância
10,0	0,2494
14,0	0,3346
18,0	0,4379
22,0	0,5450
26,0	0,6367

Figura 14. Espectros de absorção no ultravioleta da curva de calibração, hidroquinona em H_2SO_4 0,1 N; concentrações de 10,0 a 26,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 15. Curva de calibração obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta. Concentração das soluções de 10,0 a 26,0 µg/mL de hidroquinona em H₂SO₄ 0,1 N. Leituras efetuadas a 289,0 nm.

Tabela 10. Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva de calibração da hidroquinona pelo método espectrofotométrico direto a 289,0 nm. Intervalo de concentração de 10,0 a 26,0 µg/mL em H₂SO₄ 0,1 N.

	λ max	a	b	r	Ser	ta
Hidroquinona	289,0	-0,00253	0,02462	0,9999	1,5092	0,2550

a = intersecção da reta

b = inclinação da reta

r = coeficiente de correlação

Ser = desvio padrão relativo

ta = teste de significância de a

5.4.1.3 Pesquisa de interferentes

Figura 16. Espectro de absorção no ultravioleta do H_2SO_4 0,1 N, utilizando água destilada como branco.

Figura 17. Espectros de absorção no ultravioleta do gel base em H_2SO_4 0,1 N. Concentrações equivalentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 $\mu\text{g/mL}$ de hidroquinona.

Figura 18. Espectros de absorção no ultravioleta do creme base em H_2SO_4 0,1 N. Concentrações equivalentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 $\mu\text{g/mL}$ de hidroquinona.

5.4.2 Método espectrofotométrico derivado no UV

5.4.2.1 Construção da curva de calibração da primeira derivada a 302,0 nm para a hidroquinona em H_2SO_4 0,1 N e tratamento estatístico

Tabela 11. Resultados obtidos na determinação da curva de calibração da hidroquinona em H_2SO_4 0,1 N. Leituras efetuadas na primeira derivada a 302,0 nm. Intervalo de concentração de 10,0 a 26,0 $\mu\text{g/mL}$.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	Amplitude 302,0 nm
10,0	-0,1794
14,0	-0,2426
18,0	-0,3170
22,0	-0,3935
26,0	-0,4552

Figura 19. Espectros no ultravioleta da primeira derivada da hidroquinona em H₂SO₄ 0,1 N. Leituras efetuadas a 302,0 nm. Intervalo de concentração de 10,0 a 26,0 µg/mL.

Figura 20. Curva de calibração obtida pelo método espectrofotométrico derivado. Concentração das soluções de 10,0 a 26,0 µg/mL de hidroquinona em H₂SO₄ 0,1 N. Leituras efetuadas a 302,0 nm.

Tabela 12. Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva de calibração da hidroquinona. Leituras efetuadas na primeira derivada a 302,0. Intervalo de concentração de 10,0 a 26,0 $\mu\text{g/mL}$.

	λ max	a	b	r	Ser	ta
Hidroquinona	302,0	0,00142	0,01756	0,9999	1,5051	0,1985

a = intersecção da reta

b = inclinação da reta

r = coeficiente de correlação

Ser = desvio padrão relativo

ta = teste de significância de a

5.4.2.2 Pesquisa de interferentes

Figura 21. Espectros da primeira derivada do gel base em H_2SO_4 0,1 N. Concentrações equivalentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 $\mu\text{g/mL}$ de hidroquinona.

Figura 22. Espectros da primeira derivada do creme base em H_2SO_4 0,1 N. Concentrações equivalentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 $\mu\text{g/mL}$ de hidroquinona.

5.4.2.3 Determinação do teor de hidroquinona nas amostras pelo método espectrofotométrico derivado no UV a 302,0 nm

Tabela 13. Resultados obtidos na determinação do teor da hidroquinona gel pelo método espectrofotométrico derivado a 302,0 nm.

Amostra	Valor rotulado de hidroquinona (g/100g)	Valor encontrado de hidroquinona* (g/100g)	Teor Porcentual (%)
A	2,0	2,058	102,9
B	4,0	4,054	101,4
C	2,0	2,011	100,6
D	4,0	4,075	101,9

* Média de dez determinações

Tabela 14. Resultados estatísticos obtidos na determinação da hidroquinona gel pelo método espectrofotométrico derivado a 302,0 nm.

Amostra	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)	Intervalo de confiança P = 95%
A	0,158	0,853	0,11
B	0,151	0,828	0,11
C	0,150	0,826	0,11
D	0,156	0,849	0,11

Tabela 15. Resultados obtidos na determinação do teor da hidroquinona creme pelo método espectrofotométrico derivado a 302,0 nm.

Amostra	Valor rotulado de hidroquinona (g/100g)	Valor encontrado de hidroquinona* (g/100g)	Teor porcentual (%)
I	2,0	1,870	93,5
II	4,0	3,916	97,9
III	4,0	4,057	101,4

* Média de dez determinações

Tabela 16. Resultados estatísticos obtidos na determinação da hidroquinona creme pelo método espectrofotométrico derivado a 302,0 nm.

Amostra	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)	Intervalo de confiança P = 95%
I	0,163	0,968	0,12
II	0,150	0,854	0,11
III	0,148	0,812	0,11

5.4.2.4 Teste de recuperação

Tabela 17. Resultados obtidos na recuperação de solução padrão de hidroquinona adicionada aos géis A, B, C e D empregando o método espectrofotométrico derivado no ultravioleta. Método quantitativo zero-pico com leituras a 302,0 nm.

Amostra	Quantidade (µg/mL)		Recuperação (%)
	Adicionada	Recuperada	
A	1,0	1,009	100,9
	5,0	4,972	99,4
	10,0	9,819	98,2
B	1,0	0,989	98,9
	5,0	4,970	99,4
	10,0	9,839	98,4
C	1,0	1,007	100,7
	5,0	4,962	99,2
	10,0	9,833	98,3
D	1,0	0,998	99,8
	5,0	4,954	99,1
	10,0	9,853	98,5

Tabela 18. Resultados obtidos na recuperação de solução padrão de hidroquinona adicionada aos cremes I, II, e III empregando o método espectrofotométrico derivado no ultravioleta. Método quantitativo zero-pico com leituras a 302,0 nm.

Amostra	Quantidade ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Recuperada	
I	1,0	0,986	98,6
	5,0	4,914	98,3
	10,0	10,000	100,0
II	1,0	0,999	99,9
	5,0	4,959	99,2
	10,0	9,833	98,3
III	1,0	1,000	100,0
	5,0	4,939	98,8
	10,0	9,838	98,4

5.4.2.5 Limite de detecção e quantificação

Tabela 19. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação empregando o método espectrofotométrico derivado para hidroquinona.

Número	Amplitude (2,0 $\mu\text{g/mL}$)	Amplitude (4,0 $\mu\text{g/mL}$)	Amplitude (6,0 $\mu\text{g/mL}$)	Amplitude (8,0 $\mu\text{g/mL}$)	Amplitude (10,0 $\mu\text{g/mL}$)
1	-0,0321	-0,0662	-0,0986	-0,1303	-0,1661
2	-0,0318	-0,0664	-0,0992	-0,1345	-0,1665
3	-0,0326	-0,0670	-0,0989	-0,1316	-0,1654
Valor médio	-0,0322	-0,0665	-0,0989	-0,1321	-0,1660
DP	0,0004041	0,0004163	0,000300	0,0021501	0,0005567

Desvio padrão médio = 0,000765; inclinação da curva de calibração = -0,0166

Limite de detecção = 0,14 $\mu\text{g/mL}$; Limite de quantificação = 0,46 $\mu\text{g/mL}$

5.4.3 Método cromatográfico

5.4.3.1 Construção da curva de calibração do método cromatográfico e tratamento estatístico

Tabela 20. Resultados obtidos na determinação da curva de calibração da hidroquinona pelo método cromatográfico.

Concentração µg/mL	Área
6,0	3892,0
12,0	7760,7
18,0	11543,0
24,0	15645,3
30,0	19125,3

Figura 23. Curva de calibração obtida pelo método cromatográfico. Concentração das soluções de 6,0 a 30,0 µg/mL de hidroquinona. Fase móvel metanol:água (20:80 v/v).

Tabela 21. Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva de calibração da hidroquinona pelo método cromatográfico.

Hidroquinona	a	b	r	Ser	ta
	87,8700	639,1886	0,9999	1,3143	0,5498

a = intersecção da reta

b = inclinação da reta

r = coeficiente de correlação

Ser = desvio padrão relativo

ta = teste de significância de a

5.4.3.2 Pesquisa de interferentes

Figura 24. Cromatogramas obtidos do gel base (W), creme base (X), padrão de hidroquinona 18,0 µg/mL (P), amostra C (Y) e amostra III (Z). Condições cromatográficas: Coluna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm); fase móvel, metanol/água v/v (20:80); vazão 1,0 mL/min; detecção UV: 289,0 nm a temperatura ambiente.

5.4.3.3 Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas

Tabela 22. Resultados obtidos na determinação do teor da hidroquinona gel pelo método cromatográfico.

Amostra	Valor rotulado de hidroquinona (g/100g)	Valor encontrado de hidroquinona* (g/100g)	Teor porcentual (%)
A	2,0	2,054	102,7
B	4,0	4,121	103,0
C	2,0	2,025	101,2
D	4,0	4,078	101,9

* Média de dez determinações

Tabela 23. Resultados estatísticos obtidos na determinação da hidroquinona gel pelo método cromatográfico.

Amostra	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)	Intervalo de confiança P = 95%
A	0,174	0,924	0,12
B	0,157	0,832	0,11
C	0,156	0,837	0,11
D	0,171	0,933	0,12

Tabela 24. Resultados obtidos na determinação do teor da hidroquinona creme pelo método cromatográfico.

Amostra	Valor rotulado de hidroquinona (g/100g)	Valor encontrado de hidroquinona* (g/100g)	Teor porcentual (%)
I	2,0	1,913	95,7
II	4,0	3,935	98,4
III	4,0	4,040	101,0

* Média de dez determinações

Tabela 25. Resultados estatísticos obtidos na determinação da hidroquinona creme pelo método cromatográfico.

Amostra	Desvio padrão	Desvio padrão relativo (%)	Intervalo de confiança P = 95%
I	0,233	1,326	0,17
II	0,237	1,311	0,17
III	0,203	1,118	0,14

5.4.3.4 Teste de recuperação

Tabela 26. Resultados obtidos na recuperação de solução padrão de hidroquinona adicionada aos géis A, B, C e D empregando o método cromatográfico.

Amostra	Quantidade ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Recuperada	
A	1,0	0,983	98,3
	4,0	3,972	99,3
	5,0	4,958	99,1
B	1,0	0,972	97,2
	4,0	4,023	100,6
	5,0	4,934	98,8
C	1,0	1,018	101,8
	4,0	3,973	99,3
	5,0	4,968	99,4
D	1,0	0,989	98,9
	4,0	4,007	100,2
	5,0	4,932	98,6

Tabela 27. Resultados obtidos na recuperação de solução padrão de hidroquinona adicionada aos cremes empregando o método cromatográfico.

Amostra	Quantidade ($\mu\text{g/mL}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Recuperada	
I	1,0	0,982	98,2
	4,0	3,950	98,8
	5,0	4,950	99,0
II	1,0	0,995	99,5
	4,0	4,015	100,5
	5,0	4,950	99,0
III	1,0	0,989	98,9
	4,0	4,980	99,6
	5,0	5,035	100,7

5.4.3.5 Limite de detecção e quantificação

Tabela 28. Resultados obtidos para o cálculo dos limites de detecção e quantificação empregando o método cromatográfico para hidroquinona.

Número	Área (2,0 $\mu\text{g/mL}$)	Área (4,0 $\mu\text{g/mL}$)	Área (6,0 $\mu\text{g/mL}$)	Área (8,0 $\mu\text{g/mL}$)	Área (10,0 $\mu\text{g/mL}$)
1	1338	2638	3976	5341	6711
2	1340	2631	4015	5353	6760
3	1283	2654	3982	5327	6722
4	1316	2649	3990	5315	6727
5	1293	2662	3995	5318	6729
Valor médio	1314,0	2646,8	3991,4	5330,8	6729,8
DP	25,78	12,40	14,93	16,01	18,27

Desvio padrão médio = 17,478; inclinação da curva de calibração = 675,78

Limite de detecção = 0,08 $\mu\text{g/mL}$; Limite de quantificação = 0,26 $\mu\text{g/mL}$

5.5 Comparação estatística dos métodos propostos

Tabela 29. Valores obtidos para o teste F do método espectrofotométrico derivado e cromatográfico. Valor tabelado de F para 95 % nível de confiança e 9 graus de liberdade no numerador e denominador: 3,18.

Amostra	Valor experimental de F
A	1,213
B	1,081
C	1,082
D	1,201
I	2,043
II	2,496
III	1,881

Tabela 30. Valores obtidos para o teste t do método espectrofotométrico derivado e cromatográfico. Valor tabelado de t para 95 % nível de confiança e 18 graus de liberdade: 2,101

Amostra	Valor experimental de t
A	0,054
B	0,973
C	0,204
D	0,041
I	0,478
II	0,214
III	0,214

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A Farmacopéia Brasileira terceira edição (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977) apresenta somente métodos para identificação da hidroquinona como matéria-prima e testes de determinação de impurezas. A Farmacopéia Brasileira na quarta edição (FARMACOPÉIA Brasileira, 1996) ainda não apresentou a monografia correspondente à hidroquinona como matéria-prima e em formulações farmacêuticas. Entre os compêndios oficiais que apresentam métodos de quantificação da hidroquinona em formulações farmacêuticas, estão a Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED States Pharmacopeia, 2002) e a sexta Diretiva da Comunidade Européia, a qual propõe uma metodologia de análise para produtos cosméticos com hidroquinona (Sixth Directive 95/32 EC of the Commission, 1995).

Com o objetivo de garantir a segurança do consumidor e dosagem dos produtos despigmentadores a base de hidroquinona, é necessário desenvolver metodologias analíticas, simples, rápidas e com resultados confiáveis. No presente trabalho, foi analisada a hidroquinona em produtos cosméticos (cremes e géis 2%) e medicamentos (cremes e géis 4%) pelos métodos espectrofotométrico no UV derivado e cromatográfico.

Foram avaliados cinco parâmetros para a validação do método espectrofotométrico no UV derivado: linearidade, especificidade, precisão, limite de detecção e quantificação e exatidão. Para o método cromatográfico foram avaliados os parâmetros: linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação. Os resultados obtidos nos parâmetros de validação dos métodos foram submetidos a testes estatísticos para determinar sua significância, garantindo com isto a utilização do método para a determinação de hidroquinona seja em cosméticos ou medicamentos, nas formas farmacêuticas de creme ou gel, que são os mais empregados nas formulações despigmentadoras comercializadas na atualidade.

6.1 Identificação

Devido a falta de padrão de referência para o desenvolvimento dos testes de identificação, a hidroquinona fornecida pelo laboratório Stiefel S. A., foi utilizada como padrão secundário e utilizado nos testes de identificação.

Na determinação do espectro no infravermelho, podem-se observar bandas de absorção semelhantes às apresentadas na literatura para hidroquinona (Figura 9) (MOFFAT, et al., 1986), (KELLER, 1986), (MILLS III, et al., 1987), (SZYMANSKI, 1967). As principais bandas de absorção (Tabela 1) foram: 3193,24 e 1208,59 do grupo hidroxila, correspondendo ao estiramento e deformação respectivamente (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). As bandas em 1515,94 e 1468,49 caracterizam o estiramento simétrico e assimétrico do grupo C-C (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000). Por último, uma banda aguda em 828,79 correspondente à deformação C-H do anel aromático dissubstituído em posição para, e uma banda em 760,36 característica da deformação grupo HC=CH do anel aromático (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

O espectro de absorção no ultravioleta apresentou uma absorção máxima a 293,6 nm em metanol (Figura 10), este comprimento de onda está dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte (UNITED States Pharmacopeia, 2002) e a Farmacopéia Brasileira terceira edição (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977), o qual é de 293 ± 2 nm.

A Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte 25 edição (UNITED States Pharmacopeia, 2002) e a Farmacopéia Brasileira terceira edição (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977), também propõem a identificação por cromatografia em camada delgada, utilizando um padrão primário como referência. Não foi utilizado este padrão primário, porém o teste foi realizado sob as mesmas condições no padrão secundário, obtendo-se valores de Rf entre 0,87 e 0,89, sendo próximas do valor citado nas referências antes mencionadas (Rf cerca de 0,86), Figura 11 e Tabela 2.

6.2 Ensaio de qualidade baseado em medidas físicas

A determinação da faixa de fusão da hidroquinona apresentou resultados compreendidos em um intervalo entre 171° e 177° C (Tabela 3), sendo mais amplo do que o especificado pela Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte 25 edição (172–174 °C) (UNITED States Pharmacopeia, 2002) e encontrada na literatura (MERCK, 2001), (REMITON, 2000), (VERSCHUEREN, 2001).

6.3 Ensaios de pureza

Realizaram-se quatro ensaios de pureza da hidroquinona como matéria-prima. O ensaio de perda por dessecação apresentou uma média de 0,51%, este resultado fica dentro dos limites máximos permitidos pela Farmacopéia Brasileira terceira edição (máximo 1,0%) (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977).

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de Karl-Fischer. Baseia-se no princípio que quando a amostra é adicionada a uma solução de piridina e metanol com dióxido de enxofre e iodeto solúvel, o ponto final é localizado por um par de eletrodos que operam como um sistema de detecção biamperométrico e indicam a presença do iodo livre. Uma vez que um mol de iodo reage com um mol de água, conclui-se que 1,0 mg de água é equivalente a 10,71 coulombs (MENDHAM, e col., 2002). O resultado obtido teve uma média de 0,37% (Tabela 5), o qual está dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte 25 edição (máximo 0,5%) (UNITED States Pharmacopeia, 2002), indicando que a matéria-prima não possui água absorvida do ambiente.

O ensaio de resíduo pela incineração realizou-se mediante a calcinação da matéria-prima de hidroquinona, o resultado mostrou uma média de 0,21% (Tabela 6), o qual está dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia dos Estados Unidos da América do Norte 25 edição (UNITED States Pharmacopeia, 2002) e pela Farmacopéia Brasileira terceira edição (máximo

0,5%) (FARMACOPÉIA Brasileira, 1977), indicando que não contém quantidades em excesso de metais.

A determinação do doseamento da hidroquinona como matéria-prima, realizou-se mediante titulação com sulfato de cério 0,1 N. Na realização do ensaio a cor da solução passava de amarelo a violeta indicando o ponto final, a média das três determinações foi de 99,8 % (Tabela 7), valor que está dentro dos limites aceitáveis para a utilização na produção de formulações farmacêuticas (99,0-100,5%) (UNITED States Pharmacopeia, 2002), (USP DI, 1997).

6.4 Metodologia analítica

6.4.1 Espectrofotometria direta no UV

A hidroquinona é facilmente solúvel em água, mas por ter em sua estrutura grupos hidroxila é muito susceptível à ionização. Realizaram-se testes com diferentes solventes, entre eles metanol, etanol absoluto, HCl 0,1 N e H₂SO₄ 0,1 N, com o propósito de escolher aquele que fosse o mais apropriado. Utilizou-se uma solução de H₂SO₄ 0,1 N para manter a molécula em sua forma não ionizada, evitando alterações estruturais e mudanças nas respostas espectrométricas e também por não causar danos ao ambiente e baixo custo.

6.4.1.1 Curva de Ringbom

Para a construção da curva de Ringbom foram utilizadas vinte soluções com concentrações entre 2,0 e 40,0 µg/mL (Tabela 8). O gráfico da curva foi obtido plotando a transmitância versus o logaritmo da concentração (Figura 12). Mediante a curva de Ringbom pode-se verificar se um determinado sistema obedece à lei de Lambert-Beer e qual a zona de absorbância onde o erro relativo da concentração é mínimo (GONÇALVES, 1990).

A faixa de concentração que obedeceu à lei de Lambert-Beer foi aproximadamente entre 10,0 e 26,0 µg/mL, sendo esta a faixa de concentração utilizada para a construção da curva de calibração.

6.4.1.2 Curva de calibração

A partir da curva de Ringbom foi traçada a curva de calibração, escolhendo a parte linear da mesma. Em um método analítico, a linearidade pode ser determinada mediante a análise estatística de regressão linear; consegue-se com isto determinar a proporcionalidade entre a resposta instrumental e a concentração do analito a ser determinado (BRITTAİN, 1998). A curva de calibração foi construída no intervalo entre 10,0 a 26,0 µg/mL, tendo como ponto médio da curva a concentração de 18,0 µg/mL, com absorbância de 0,4379 a qual corresponde ao menor erro espectrofotométrico para determinações quantitativas (EWING, 1972). (Tabela 9, Figuras 14, 15).

A curva de calibração obtida foi submetida a tratamento estatístico pelo método dos mínimos quadrados. Observou-se que a curva passa próxima da origem, uma vez que o valor da intersecção da reta (a) não é significativo, indicando com isto que o método não está sujeito a erros determinados (DAVIS, et al., 1978).

6.4.1.3 Pesquisa de interferentes

A finalidade desta pesquisa foi observar o grau de interferência dos excipientes na determinação, a medida em que estes aumentavam na preparação. Este teste foi realizado para comprovar a especificidade do método. A habilidade de uma metodologia analítica para medir exatamente a concentração de uma substância específica em uma matriz chama-se especificidade (BRITTAİN, 1998). As Figuras 17 e 18 mostram os espectros de absorção no UV obtidos com as amostras do gel e creme base respectivamente. Observa-se que a medida que a concentração aumenta, a

absorção dos excipientes na formulação também aumenta, não sendo possível a quantificação da hidroquinona nos seus máximos de absorção a 289,0 e 221,5 nm. Devido à presença desses constituintes não é possível quantificar a hidroquinona pela espectrofotometria direta. Foi necessário desenvolver um método espectrofotométrico derivado.

6.4.2 Método espectrofotométrico derivado

6.4.2.1 Parâmetros estabelecidos

Escolheu-se a derivada de primeira ordem para a determinação da hidroquinona nas amostras, pois nesta curva a interferência dos excipientes observada na espectrofotometria direta é eliminada. O delta lambda utilizado foi de 2,0 nm, valores maiores aumentavam o sinal de ruído e valores menores diminuía a amplitude da curva. A velocidade de varredura do espectro foi de 370 nm/min, que ofereceu boa resolução. O assentamento das ordenadas foi estabelecido entre +0,5 e -1,0. Estes limites oferecem uma boa visualização dos espectros (Figura 19). Escolheu-se o método zero pico na faixa do comprimento de onda na qual anulavam-se os excipientes para a quantificação da hidroquinona nas formulações.

6.4.2.2 Construção das curvas de calibração

A Figura 19 apresenta os espectros derivados da primeira ordem obtidos nas curvas de calibração nas concentrações de 10,0 a 26,0 µg/mL. A curva (Figura 20) apresenta boa linearidade nas concentrações analíticas. Realizaram-se as leituras a 302,0 nm e, a medida que aumentava a concentração também aumentava de maneira proporcional a amplitude, apresentando um coeficiente de correlação de 0,9999 e teste de significância de t de 0,1985 (Tabela 12).

6.4.2.3 Pesquisa dos interferentes

Este teste foi realizado com o gel e creme base (amostras placebo). As concentrações foram correspondentes a 12,0; 16,0; 20,0 e 24,0 µg/mL de hidroquinona. Observou-se que a medida em que aumentava a concentração dos excipientes, a amplitude destes também aumentava gradualmente. Os resultados obtidos nestes testes podem ser observados nas Figuras 21 e 22. Porém, independentemente da concentração utilizada, existem vários pontos no qual a amplitude dos excipientes é zerada, isto é não há interferência destes na determinação da hidroquinona nas amostras. Utilizou-se um ponto de leitura único, sendo 302,0 nm; neste ponto a concentração de hidroquinona apresentava incremento proporcional.

6.4.2.4 Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas

A aplicação do método espectrofotométrico derivado no UV em todas as amostras apresentou resultados satisfatórios, o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) que indica a precisão do método está dentro das normas estabelecidas oficialmente (menor que 2%), indicando que existe um alto grau de concordância (repetibilidade) entre os valores experimentais (BRUCE, et al., 1998), (ICH Q2a, 2003), (SHABIR, 2003). Os resultados podem ser observados nas Tabelas 13 e 15. O desvio padrão relativo foi calculado para cada amostra empregando-se dez determinações, podendo-se observar que o valor deste em todas as amostras é baixo, indicando boa repetibilidade do método e uma alta concordância entre os resultados obtidos (Tabelas 14 e 16).

6.4.2.5 Teste de recuperação

O teste de recuperação demonstra a exatidão de um método analítico. A exatidão é definida como o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência (ICH Q2a, 2003),

(UNITED States Pharmacopeia, 2002). As Tabelas 17 e 18 mostram os resultados obtidos no teste de recuperação nas amostras pesquisadas. Pode-se observar que os resultados apresentam pouca dispersão, estando entre 98,2 e 100,9% para os géis e entre 98,3 e 100,0% para os cremes, considerando-se o método exato.

6.4.2.6 Limite de detecção e quantificação

A fim de verificar o limite de detecção e quantificação do método analítico, realizou-se uma curva de calibração com baixas concentrações (entre 2,0 e 10,0 µg/mL). O desvio padrão foi dividido pela inclinação da curva de calibração para se obter uma estimativa do ruído associado ao método. O limite de detecção aceitável é de três vezes o valor do sinal-ruído do método e o limite de quantificação deve ser dez vezes o valor do sinal-ruído (SWARTZ e KRULL, 1998), (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

A Tabela 19 mostra os resultados obtidos para o limite de detecção e limite de quantificação da hidroquinona no método cromatográfico, sendo este 0,14 e 0,46 µg/mL respectivamente.

6.4.3 Método cromatográfico

O segundo método desenvolvido foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), empregando a modalidade em fase reversa (coluna cromatográfica empacotada com octadecilsilano para a separação), na qual existe uma competição das moléculas da amostra e a fase móvel em ocupar sítios ativos da superfície da fase estacionária apolar, utilizando uma fase móvel polar.

Com o propósito de desenvolver uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e toxicidade, optou-se por utilizar metanol e água como fase móvel por

sua fácil obtenção. O espectro de absorção no ultravioleta da hidroquinona na fase móvel metanol:água (20:80 v/v), apresenta dois máximos de absorção, a 222,0 e 289,0 nm. Não foi utilizado o comprimento de onda a 222,0 nm por se encontrar muito próximo do “cut-off” para metanol, fixando as leituras para o método cromatográfico a 289,0 nm.

6.4.3.1 Parâmetros estabelecidos

Foram fixados para obter-se um tempo de análise adequado, boa resolução e forma dos picos, como pode-se observar nos cromatogramas da Figura 24. O comprimento de onda selecionado foi 289,0 nm visto que nesta região observou-se que a hidroquinona absorve de forma proporcional. A vazão utilizada foi de 1,0 mL/min, já que vazões menores aumentam o tempo de análise. A velocidade do papel foi fixada em 5 mm/min, valores maiores aumentam a largura do pico e valores menores a diminuem com perda da forma do pico cromatográfico.

6.4.3.2 Construção da curva de calibração

A curva de calibração, Figura 23, foi construída no intervalo de 6,0 a 30,0 µg/mL. Obteve-se uma boa linearidade entre as áreas versus a concentração, existindo um aumento proporcional a medida em que as concentrações aumentavam, com um coeficiente de correlação de 0,9999 (Tabela 21). A curva passa próxima da origem já que o teste de significância de “a” foi de 0,5498, que é menor do que o valor tabulado.

6.4.3.3 Pesquisa de interferentes

A finalidade desta pesquisa foi observar o grau de interferência dos excipientes na determinação. A Figura 24 mostra o teste realizado na pesquisa dos interferentes a partir dos excipientes, feito com o gel e creme

base. Observa-se que as bases não apresentam nenhum componente que possa interferir com a absorção da hidroquinona nas amostras testadas.

6.4.3.4 Determinação do teor de hidroquinona nas amostras manipuladas e industrializadas

As Tabelas 22 e 24 apresentam os resultados obtidos na determinação da hidroquinona nas amostras pesquisadas. O desvio padrão relativo foi calculado para cada amostra empregando-se 10 determinações variando entre 0,832 e 0,933 % para os géis e entre 1,118 e 1,326 % para os cremes (Tabelas 23 e 25) indicando boa repetibilidade do método e concordância entre os resultados (SWARTZ e KRULL, 1998), (VALENTE, 2001). Os resultados deste método também foram muito similares aos resultados do método cromatográfico derivado a 302,0 nm.

6.4.3.5 Teste de recuperação

As Tabelas 26 e 27 mostram os resultados obtidos para o teste de recuperação das amostras pesquisadas. Observa-se pouca dispersão nos resultados, sendo entre 97,2 e 100,6% para os géis e 98,2 e 100,7% para os cremes, estando estes dentro dos limites estabelecidos (BRUCE, et al., 1998), (GREEM, 1996), (ICH Q2b, 2003). Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o método pode ser aplicado ao doseamento de hidroquinona nas amostras pesquisadas. Quanto mais se aproxima uma medida a um valor verdadeiro, considera-se o método mais exato (BRITAIN, 1998).

6.4.3.6 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) de uma metodologia analítica representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento

experimental (ICH Q2b, 2003), (SWARTZ e KRULL, 1998). O limite de quantificação (LQ) de uma metodologia analítica representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser exata e precisamente medida com um certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH Q2b, 2003), (SWARTZ e KRULL, 1998).

A fim de verificar o limite de detecção e quantificação do método analítico, realizou-se uma curva de calibração com baixas concentrações (entre 2,0 e 10,0 µg/mL). O desvio padrão foi dividido pela inclinação da curva de calibração para se obter uma estimativa do ruído associado ao método. O limite de detecção aceitável é de três vezes o valor do sinal-ruído do método e o limite de quantificação deve ser dez vezes o valor do sinal-ruído (SWARTZ e KRULL, 1998), (UNITED States Pharmacopeia, 2002).

A Tabela 28 mostra os resultados obtidos para o limite de detecção e limite de quantificação da hidroquinona no método cromatográfico, sendo este 0,08 e 0,26 µg/mL respectivamente.

6.5 Comparação estatística dos métodos propostos

Testes de significância são usados com a finalidade de verificar se a diferença entre dois resultados é significativa ou pode ser atribuída ao acaso (CAULCUTT and BODDY, 1983), (MILLER, e col., 1993). Estes testes foram utilizados para comparar o método espectrofotométrico derivado e cromatográfico na determinação da hidroquinona em géis e cremes. As tabelas 29 e 30 apresentam os valores de F e t respectivamente na comparação dos métodos espectrofotométrico derivado e cromatográfico. Observa-se que nenhum resultado ultrapassa o valor tabelado para um nível de confiança de 95%.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- A hidroquinona matéria-prima foi caracterizada mediante técnicas espectrométricas (espectrometria no infravermelho, espectrofotometria no UV), cromatográficas (cromatografia em camada delgada) e físico-químicas, permitindo a preparação da monografia para a Farmacopéia Brasileira quarta edição.
- A espectrofotometria direta no ultravioleta utilizando como solvente H_2SO_4 0,1 N, não pode ser utilizada como metodologia analítica, para determinação da hidroquinona em formulações farmacêuticas e cosméticas porque os excipientes presentes na formulação absorvem de forma significativa nos dois comprimentos de onda máximos da hidroquinona.
- As metodologias propostas (espectrofotometria derivada no UV e cromatografia líquida de alta eficiência) foram validadas obtendo resultados satisfatórios.
- As metodologias propostas (espectrofotometria derivada no UV e cromatografia líquida de alta eficiência) podem ser aplicadas às amostras pesquisadas.
- Os métodos espectrofotométrico derivado no UV e cromatográfico são comparáveis estatisticamente com 95% de confiança.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALIÑA, L.M.; WOSCOFF, A.; VALDEZ, R.P.; DE HERRERA, M.; SANGUINETTI, G.; CORDOVA, H.C.; DIOGUARDI, Y. Eficacia del acido azelaico vs. hidroquinona en melasma: resultados de un estudio doble ciego multicéntrico. **Arch. Argent. Dermatol.**, Buenos Aires, v.61, n.4, p.193-197, 1991.

BARBER, E.D.; HILL, T.; SCHUM, D.B. The percutaneous absorption of hydroquinone (HQ) through rat and human skin *in vitro*. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.80, n.3, p.167-172, 1995.

BLEEHEN, S.S. Skin bleaching preparations. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.28, p.407-412, 1977.

BORREMANS, M.; DE BEER, J.; GOEYENS, L. Experimental and statistical validation of HPLC analysis of hydroquinone and its 4-methoxyphenol, 4-ethoxyphenol and 4-benzyloxyphenol ethers in cosmetic products. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.50, n.5/6, p.346-352, 1999.

BOSCH, C.O.; SANCHEZ, F.R.; CANO, J.M.P. Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. **Talanta**, Amsterdam, v.42, n.9, p.1195-1214, 1995.

BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chímical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigm. Cell Res.**, Oxford, v.16, n.2, p.101-110, 2003.

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2002.

BRITISH Pharmacopoeia 1999. London: Her Majesty's Stationary Office, v.1 1520p, v.2 A395p, 1999.

BRITTAIN, H.G. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.2, n.3, p.4-9, 1998.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, Wien, v.128, p.93-106, 1998.

CASTRO, A.; CASTRO, P.L.; IRAN, D. Tratamento da hiperpigmentação: uva-ursina versus hidroquinona. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.9, n.2, p.39-43, 1997.

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistics for analytical chemists**. London, New York: Chapman & Hall, 1983. p.126-144.

CECIL, R.L.; WYNGAARDEN, J.B.; SMITH Jr., L.H.; BENNETT, J.C., eds. **Cecil tratado de medicina interna**. 19.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. v.2, p.2370-2371.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. p.28-41, 126-153.

COLLINS, C.H.; BRAGA, C.L.; BONATO, P.S., coord. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: UNICAMP, 1997. p.183-238.

CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L.; STELLA, V.J. **Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists**. 2.ed. New York: John Wiley, 1986. p.82-93.

- CRUZ, V.I.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato tissue for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, Amsterdam, v.52, n.4, p.681-689, 2000.
- DAVIS, R.B.; THOMPSON, J.E.; PARDUE, H.L. Characteristics of statistical parameters used to interpret least-squares results. **Clin. Chem.**, New York, v.24, n.4, p.611-620, 1978.
- DE CAPRIO, A.P. The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. **Crit. Rev. Toxicol.**, Lauderdale, v.29, n.3, p.283-330, 1999.
- DEF 2002/2003: dicionário de especialidades farmacêuticas. Rio de Janeiro: EPUC, 2002. p.328, 982-983.
- DESIDERIO, C.; OSSICINI, L.; FANALI, S. Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.887, n.2, p.489-496, 2000.
- DIVINCENZO, G.D.; HAMILTON, M.L.; REYNOLDS, R.C.; ZIEGLER, D.A. Metabolic fate and disposition of [14C] hydroquinone given orally to sprague-dawley rats. **Toxicology**, Amsterdam, v.33, n.1, p.9-18, 1984.
- ELLENHORN, M.J.; SCHONWALD, S.; ORDOG, G. **Ellenhorn's medical toxicology**: diagnosis and treatment of human poisoning. 2.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.1445-1447.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1015p.,1996.
- EWING, G.W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972. v.1, p.48-64.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Andrei, 1977. p.532-524.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, pt.1 e pt.2, 1996.

FERIOLI, V.; RUSTICHELLI, C.; PAVESI, G.; GAMBERINI, G. New combined treatment of hypermelanosis: analytical studies on efficacy and stability improvement. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.23, n.6, p.333-340, 2001.

FIRTH, J.; RIX, I. Determination of hydroquinone in skin-toning creams using high-performance liquid chromatography. **Analyst**, Letchworth, v.111, n.2, p.129-132, 1986.

GAGLIARDI, L.; AMATO, A.; CAVAZZUTTI, G.; CHIMENTI, F.; BOLASCO, A.; TONELLI, D. Identification and quantification of hydroquinone and some of its ethers in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.404, n.1, p.267-272, 1987.

GIUDICE, P.; YVES, P. The widespread use of skin lightening creams in senegal: a persistent public health problem in West Africa. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.41, n.2, p.69-72, 2002.

GLADSTONE, H.B.; NGUYEN, S.L.; WILLIAMS, R.; OTTOMEYER, T.; WORTZMAN, M.; JEFFERS, M.; MOY, R.L. Efficacy of hydroquinone cream (USP 4%) used alone or in combination with salicylic acid peels in improving photodamage on the neck and upper chest. **Dermatol. Surg.**, New York, v.26, n.4, p.333-337, 2000.

GLÖCKL, I.; BLASCHKE, G.; VEIT, M. Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.761, n.2, p.261-266, 2001.

- GONÇALVES, M.L.S.S. **Metódos instrumentais para análise de soluções:** análise quantitativa. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. p.13-82, 609-640.
- GREEM, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, Columbus, v.68, n.9, p.305A-309A, 1996.
- GREENLEE, W.F.; CHISM, J.P.; RICKERT, D.E. A novel method for the separation and quantification of benzene metabolites using high-pressure liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.112, n.2, p.367-370, 1981.
- GUEVARA, I.L.; PANDYA, A.G. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin, and fluorinated steroid. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.40, n.3, p.212-215, 2001.
- HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. **Rev. Port. Farm.**, Lisboa. v.41, n.1, p.7-13, 1991.
- HARDMAN, J.G.; LIMBARD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman the pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.1216.
- HEMSWORTH, B.N. Biological changes due to topical application of skin lightening compounds. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.24, p.727-733, 1973.
- HOPKALA, H.; KOWALCZUK, D. Application of derivative UV spectrophotometry for the determination of enoxacin and nalidixic acid in tablets. **Pharmazie**, Eschborn, v.55, n.6, p.432-435, 2000.
- ICH Q2a. Text on validation of analytical procedure. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 24/07/2003.

ICH Q2b. Text on validation of analytical procedure: methodology. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em: 24/07/2003.

JIMBOW, K.; OBATA, H.; PATHAK, A.; FITZPATRICK, T.B. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.62, n.4, p.436-449, 1974.

KAKITA, L.S.; LOWE, N.J. Azelaic acid and glycolic acid combination therapy for facial hyperpigmentation in darker-skinned patients: a clinical comparison with hydroquinone. **Clin. Ther.**, Belle Mead, v.20, n.5, p.960-970, 1998.

KATSAMBAS, A.; ANTONIOU, CH. Melasma: classification and treatment. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v.4, n.3, p.217-223, 1995.

KATSAMBAS, A.D.; STRATIGOS, A.J. Depigmenting and bleaching agents: coping with hyperpigmentation. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, n.4, p.483-488, 2001.

KELLER, R.J. **The sigma library of FT-IR**. Saint Louis: Sigma Chemical, 1986. v.2, p.618.

KIRK-OTHMER Encyclopedia of chemical technology. 4.ed. New York: John Wiley, 1998. v.13, p.996-1014.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**. 2002/2003.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.19.18.

LEE, B.L.; ONG, H.Y.; SHI, C.Y.; ONG, C.N. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **J. Chromatogr., B.: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.619, n.2, p.259-266, 1993.

LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrophotométrie dérivée: intérêt, limites et applications. **Analusis**, Paris, v.14, n.1, p.1-20, 1986.

LIMA, H.A.; MATOS, L.F.; BRUSTEIN, F.; MASAKO, F.L.; SILVA, A.; COSTA, D. A clinical, prospective, randomized, double-blind trial comparing skin whitening complex with hydroquinone vs. placebo in the treatment of melasma. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.42, n.2, p.153-156, 2003.

LOFTSSON, T.; OLAFSSON, J.H. Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.37, n.4, p.241-246, 1998.

LUNN, G. **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. New York: John Wiley, 2000. p.708-709.

MAIBACH, H.I.; OLDMAN, T. Hydroquinone: controlled efficacy and safety. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v.50, n.2, p.114-116, 1999.

MARTINDALE: the extra pharmacopoeia. 33.ed. London: Pharmaceutical Press, 2002. p.1115.

MEDINSKY, M.A.; KENYON, E.M.; SCHLOSSER, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. **Toxicology**, Amsterdam, v.105, n.2, p.225-233, 1995.

MENDHAM, J.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS, M., rev. **Vogel análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p.254-255.

MERCK index. 13.ed. Withehouse Station, 2001. p.4836.

MILLER, J.C.; MILLER, J.M.; IZQUIERDO, H.R.; MATE, J.C. **Estadística para química analítica**. 2.ed. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 1993. p.20-63.

- MILLS III, T.; ROBERSON, C.J.; FISHER, B.A.J., eds. **Instrumental data for drug analysis**. 2.ed. New York: Elsevier, 1987. v.2, p.1126-1127, v.4, p.2517-2518, 2550. (Elsevier Series in Forensis and Police Science).
- MOFFAT, A.C.; JACKSON, J.V.; MOSS, M.S.; WIDDOP, B. Ultraviolet, visible and fluorescence spectrophotometry. In: _____, eds. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.221-232, 669.
- MOHAMED, A.; MOHAMED, M. Topical hydroquinone in the treatment of some hyperpigmentary disorders. **Int. J. Dermatol.**, Oxford, v.37, n.6, p.449-450, 1998.
- MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.28, n.10, p.1185-1189, 1976.
- O'DONOGHUE, J.; BARBER, E.D.; HILL, T.; AEBI, J.; FIORICA, L. Hydroquinone: Ggenotoxicity an prevention of genotoxicity following ingestion. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.37, n.9/10, p.931-936, 1999.
- OZLUER, S.M.; MUIR, J. Nail staining from hydroquinone cream. signs, syndromes and diagnoses. **Australas. J. Dermatol.**, Glebe, v.41, n.3, p.255-256, 2000.
- PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M.; MISURACA, G.; PROTA, G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1073, n.1, p.85-90, 1991.
- PENNEY, K.B.; SMITH, C.J.; ALLEN, C.J. Depigmenting actions of hydroquinone depends on disruption of fundamental cell processes. **J. Invest. Dermatol.**, Malden, v.82, n.4, p.308-310, 1984.

- PEREIRA, J.C. Depigmentantes cutâneos. **Rev. Cosmiatría Med. Estética**, São Paulo, v.1, n.2, p.6-12, 1993.
- POPOV, A.; YANISHLIEVA, N. Spektrophotometrische bestimmung von hydrochinon als chinon in crememasse. **Fresenius' Z. Anal. Chem.**, Wiesbaden, v.129, p.191-192, 1970.
- PROTA, G. Melanins and melanogenesis. **Cosmet. Toiletries**, Carol Stream, v.111, n.5, p.43-51, 1996.
- REMYINGTON: the science na practice pharmacy. 20.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.1215.
- RUEDA, M.E.; SARABIA, L.A.; HERRERO, A.; ORTIZ, M.C. Optimisation of a flow injection system with electrochemical detection using the desirability function application to the determination of hydroquinone in cosmetic. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.479, n.2, p.173-184, 2003.
- SAKODINSKAYA, I.K.; DESIDERIO, C.; NARDI, A.; FANALI, S. Micellar electrokinetic chromatographic study of hydroquinone and some of its ethers. determination of hydroquinone in skin-toning cream. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.596, n.1, p.95-100, 1992.
- SANCHEZ, R.F.; BOSCH, O.C.; CANO, P.J.M. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. **Talanta**, Amsterdam, v.35, n.10, p.753-761, 1988.
- SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requeriments of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.987, n.1/2, p.57-66, 2003.

- SHARMA, O.P.; BHAT, T.K.; SINGH, B. Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resorcinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and tannic acid. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.822, n.1, p.167-171, 1998.
- SILVA, P.; RESENDE, A., coords. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.1242.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. p.67-101.
- Sixth Directive 95/32 EC of the Commission. Off. J. Eur. Commun., 1995 L 178. Disponível em: <http://www.europa.eu.int>. Acesso em: 24/07/2003.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.597-619, 640-661.
- SPENCER, M.C. Hydroquinone bleaching. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.84, p.131-134, 1961.
- SPENCER, M.C.; BECKER, S.W. A hydroquinone effect. **Clin. Med.**, London, v.70, p.1111-1114, 1963.
- SU, E.G. A comparasion of skin lightening agents. **J. Cosmet. Sci.**, New York, v.49, n.1, p.208-209, 1998.
- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol., Ed. Bras.**, São Paulo, v.2, n.3, p.12-20, 1998.
- SZYMANSKI, H.A. **Interpreted infrared spectra**. New York: Plenum Press, 1967. v.3, p.30.

ULLMANN'S encyclopedia of Industrial organic chemicals; starting materials and intermediates. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. v.5, p.2941-2953.

UNITED States Pharmacopeia: USP 25. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.867-868, 2256-2258.

USP DI. 17.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1997. p.IV/249. [Approved Drugs Products and Legal Requeriments, v.3].

VALENTE, S.L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data on organic chemicals**. 4.ed. New York: John Wiley, 2001. v.2, p.1291-1293.

WANG, L. Simultaneous determination of hydroquinone ethers in cosmetic after preconcentration at a carbon paste electrode. **Analyst**, Letchworth, v.120, n.8, p.2241-2244, 1995.

WITTIG, J.; WITTEMER, S.; VEIT, M. Validated method for the determination of hydroquinone in human urine by high-performance liquid chromatography-coulometric-array detection. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.761, n.1, p.125-132, 2001.

YOSHIMURA, K.; MOMOSAWA, A.; WATANABE, A.; SATO, K.; MATSUMOTO, D.; AIBA, E.; HARII, K.; YAMAMOTO, T.; AOYAMA, T.; IGA, T. Cosmetic color improvement of the nipple-areola complex by optimal use of tretinoin and hydroquinone. **Dermatol. Surg.**, New York, v.28, n.12, p.1153-1158, 2002.

ZANINI, A.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p.429.