



unesp

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**Avaliação, modificação e validação de metodologia para estudo
de estabilidade de hidroquinona em creme.**

JULIANE FARINELLI

**ARARAQUARA – SP
2008**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**Avaliação, modificação e validação de metodologia para estudo
de estabilidade de hidroquinona em creme.**

JULIANE FARINELLI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Scarpa

**ARARAQUARA – SP
2008**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Farinelli, Juliane

F225e Estudo, avaliação e modificação de modificação para a quantificação de hidroquinona em estudo de estabilidade. / Juliane Farinelli. – Araraquara, 2008.
98 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
“Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Maria Virginia Scarpa

. 1.Controle de qualidade. 2.Hidroquinona. 3.Metabissulfito de sódio. 4.Ácido alfa lipóico. I. Scarpa, Maria Viriginia, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

JULIANE FARINELLI

**“AVALIAÇÃO, MODIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA ESTUDO DE ESTABILIDADE DE
HIDROQUINONA EM CREME.”**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 24/06/2008, consideraram a candidata **Juliane Farinelli:**

() REPROVADA

(X) APROVADA

Profa. Dra. Gislaine Ricci Leonardi

1º Examinador

Profa. Dra. Hérica Nunes Salgado

2º Examinador

Profa. Dra. Maria Virginia Scarpa

Presidente/Orientadora

*Para ser grande sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
porque alta vive.*

Ricardo Reis (F.P.)

**Dedico este trabalho aos meus pais,
Sadi e Izelma e à minha irmã Gisela**

Agradecimentos

Fazer mestrado não é fácil. São superações sucessivas de coisas até então inexistentes para mim, como a distância e a saudade da minha família. São indas e vindas constantes da sala da orientadora. São tentativas incessantes para adaptar, validar metodologia e obter resultados.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado e por ouvir prontamente às minhas orações.

Agradecer à minha família. A melhor família do mundo! A minha mãe Izelma, que sempre teve uma palavra doce de conforto e coragem para me dar. Quem sempre chorava quando eu voltava à Araraquara. Ao meu pai Sadi, meu exemplo de vida! Quem sempre me apoiou! Pai saiba que tudo o que eu conquistei até hoje também é mérito seu! Quem me ensinou a contar o jardim pelas flores e não pelas folhas caídas e que persistência é quando se levanta sempre uma vez a mais que se cai! À minha irmã Gi. Agradecer pelas vezes que você veio até Araraquara ficar comigo quando eu não podia ir para casa. Pelas férias aqui com a Sis. Uma pessoa maravilhosa, cheia de vida! Como já te disse em outra ocasião, você foi a maior dádiva que a natureza me concedeu! Aos meus avós que mesmo longe, sempre perguntavam por mim. A minha madrinha Bete, pela amizade, força e conselhos.

Agradecer à minha orientadora Virgínia pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e pela amizade. Por me ensinar mais que a estabilidade acelerada e estabilidade à temperatura ambiente, por me ensinar a estabilidade emocional, sempre incentivando e acreditando que era possível melhorar!

Aos meus amigos. Não há papel suficiente no mundo para escrever o quão grata lhes sou! Aos meus amigos de Américo,. Aos meus ex-patrões

e amigos Célia e Rosato, pela compreensão e amizade. Aos meus atuais patrões, Osmar e Rosângela, por sempre entenderem quando eu chegava atrasada e quando eu tinha que sair correndo dos plantões aos fins de semana para ir para o laboratório fazer leituras! Aos meninos da farmácia, pela amizade, e por cobrirem meus horários! Ao Fábio, Maria, Rodrigo, Maira e Rogério, pela amizade sincera. Ao Marcelo por todas as nossas conversas, pela força nos momentos difíceis, pelas risadas, por essa amizade transcendental.

À minha estagiária Juliana Reis, obrigada pela dedicação, empenho e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de CQ, Marlus, Karen, Flávia, Cris, Cris e Adam pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacotécnica, Prof. Dr. Arnóbio, pelo auxílio com as derivadas do espectro, com seus conhecimentos adquiridos em Pedro Avelino, cidade modelo da região central do RN e lapidada aqui em Araraquara conosco. Obrigada pela paciência e amizade. À Velma, Flávia Chiva, Gu, Fabrício, Cris T. pelas risadas, pelas piadas, pelos cafés no corredor e pela amizade sincera.

Às minhas amigas Priscileila e Kelly. Meninas, obrigada pela paciência, pelo amor e pelo brilho todo que vocês doaram a minha vida. Obrigada por entenderem que “Não dá! Estou de Plantão!!!” e por sempre estarem lá por mim em todos os momentos. Amo muito vocês!

À Grace e à Débora. Queridas amigas! Obrigada por tudo! Por termos construído esta amizade tão verdadeira e especial.

Às minhas amigas da república, Cris e Alianda. Meninas, obrigada por tudo!

Aos meus professores da graduação Lu e Chaud que me incentivaram a vir à Araraquara fazer mestrado.

Aos Prof. Dr. Leila, Palmira, Hérica, Vítor, Raul, Anselmo, Ana Dóris. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Paschoal pelas explicações e ensinamentos

espectrofotométricos.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Correa pela atenção e amizade.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Cristiane Masetto de Gaitani (USP- RP) e Adélia Emília de Almeida (UNESP- Araraquara) que participaram da minha banca de qualificação, pelas observações oportunas que tanto enriqueceram meu trabalho.

À minha querida amiga Fátima! Pelas conversas, pelo apoio e pela amizade!

Aos funcionários da biblioteca e portaria do campus.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Resumo	v
Abstract	vii
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	20
III. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. MATERIAL	22
3.1.1. Solventes, reagentes e soluções	22
3.1.2. Equipamentos e instrumentos	22
3.2. MÉTODOS	23
3.2.1. Preparo do creme base	23
3.2.2. Estabilidade preliminar	23
3.2.3. Quantificação de HQ em creme	24
3.2.3.1. Álcool etílico	24
3.2.3.1.1. Estabilidade acelerada	22
Análise visual	25
3.2.3.1.2. Validação da metodologia	26
Linearidade	26
Precisão	26
Repetibilidade	27
Precisão intermediária	27
Exatidão e recuperação	27
3.2.3.2. Ácido sulfúrico 0,1N	28
3.2.3.2.1. Estabilidade acelerada	28
3.2.3.2.2. Validação da metodologia	29
Linearidade	29
Precisão	29
Repetibilidade	30
Precisão intermediária	30
Exatidão e recuperação	30
Pesquisa de interferentes	31

3.2.3.3. Metanol	31
3.2.3.3.2. Validação da metodologia	31
Linearidade	31
Precisão	32
Repetibilidade	32
Precisão intermediária	32
Exatidão e recuperação	33
3.2.3.3.1. Estabilidade acelerada	34
Análise visual	34
IV. RESULTADOS	36
4.1. Preparação do creme base	36
4.2. Estabilidade preliminar	36
4.3 Quantificação de HQ em creme	37
4.3.1. Álcool etílico	37
4.3.1.1. Estabilidade acelerada	38
Estabilidade acelerada a 45°C	38
Análise visual da degradação da HQ a 45°C	43
Estabilidade acelerada a 65°C	44
4.3.1.2. Validação da metodologia	47
Linearidade	47
Precisão	49
Repetibilidade	49
Precisão intermediária	50
Exatidão e recuperação	52
4.3.2. Ácido sulfúrico 0,1N	53
4.3.2.1. Estabilidade acelerada	54
4.3.2.2. Validação da metodologia	58
Linearidade	58
Precisão	59
Repetibilidade	59
Precisão intermediária	60
Exatidão e recuperação	61
Pesquisa de interferentes	63
4.3.3. Metanol	65
4.3.3.1. Validação da Metodologia	66
Linearidade	67
Precisão	67
Repetibilidade	68
Precisão intermediária	68
Exatidão	69
Recuperação	70
4.3.3.1. Estabilidade acelerada	71
Determinação do prazo de validade	84
V. CONCLUSÕES	86
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da hidroquinona.....	1
Figura 2: Representação esquemática da formação de melanina.....	2
Figura 3: Oxidação da hidroquinona.....	5
Figura 4: Ensaio de especificidade da HQ para os placebos	8
Figura 5: Determinação do pico de máxima absorção da HQ em etanol	38
Figura 6: Comparação da degradação da HQ sem antioxidante e com metabissulfito em ensaio de estabilidade a 45°C	40
Figura 7: Comparação da degradação da HQ sem antioxidante e com VC IP em ensaio de estabilidade a 45°C	41
Figura 8: Fotografia da degradação de creme contendo HQ. Da esquerda para a direita encontram-se: HQ sem antioxidante, metabissulfito de sódio 0,1%, 0,5%, 1% e 2%, VC IP 0,1%, 0,5%, 1% e 2%. Fotografias tiradas nos tempos 0 h (a) , 72 h (b) e 264 h (c)	43
Figura 9: Decomposição da HQ a 65 °C	45
Figura 10: Decomposição da HQ contendo ácido α lipóico como sistema antioxidante a 65°C	46
Figura 11: Decomposição da HQ contendo VC IP 65°C	46
Figura 12: Curva analítica de HQ em etanol	48
Figura 13: Espectro de varredura em derivada da HQ e BQ em ácido sulfúrico 0,1N	53
Figura 14: Linearidade da HQ obtida por espectrofotometria de derivada em 230 e 225 nm	54
Figura 15: Concentração de HQ remanescente em função do tempo de permanência do creme na estufa	56
Figura 16: Caracterização do deslocamento da linha base. a Espectro obtido em absorbância, b Espectro obtido em primeira derivada	57
Figura 17: Curva analítica de HQ em ácido sulfúrico 0,1N	58
Figura 18: Espectros obtidos no ensaio de recuperação de HQ utilizando ácido sulfúrico 0,1N como solvente	62
Figura 19: Sobreposição de espectros do creme contendo ácido α lipóico (linha vermelha) e HQ em solução ácido sulfúrico 0,1N a 18 μ g/mL (linha preta)	63
Figura 20: Sobreposição de espectros do creme contendo ditionito de sódio (linha vermelha) e HQ em solução ácido sulfúrico 0,1N a 18 μ g/mL (linha preta)	64
Figura 21: Sobreposição de espectros do creme contendo metabissulfito (linha vermelha) e HQ em solução ácido sulfúrico 0,1N a 18 μ g/mL (linha preta)	64
Figura 22: Caracterização e identificação do ponto de <i>zero crossing</i> da HQ em etanol. Solução de HQ a 18 μ g/mL (linha vermelha), BQ a 18 μ g/mL (linha preta)	66

Figura 23: Curva analítica de HQ em metanol	67
Figura 24: HQ remanescente em creme sem antioxidante (T = 55°C)	71
Figura 25: Ilustração esquemática da oxidação da HQ em meio básico. I – p-benzohidroquinona (HQ); II – p-benzosemiquinona; III – p-benzoquinona(BQ); IV – 2-hidroxi-p-benzohidroquinona; V - 2-hidroxi-p-benzosemihidroquinona; VI - 2-hidroxi-p-benzoquinona; VII – 2,3-epoxi-p-benzoquinona	72
Figura 26: HQ remanescente em creme com metabissulfito de sódio (T=55°C)	73
Figura 27: Perfil de degradação da HQ sem antioxidante	74
Figura 28: Perfil de degradação da HQ com ácido α lipóico	74
Figura 29: Perfil de degradação da HQ com metabissulfito de sódio	75
Figura 30: Fotografias da degradação da HQ por estresse térmico a 55°C. Análise realizada com base no escurecimento das amostras	77
Figura 31: Decomposição da HQ a 45°C sem antioxidante	79
Figura 32: Decomposição da HQ contendo metabissulfito como sistema antioxidante a 45°C	80
Figura 33: Decomposição da HQ contendo ácido α lipóico como sistema antioxidante a 45°C	81
Figura 34: Fotografias da degradação da HQ por estresse térmico a 45°C. Análise realizada com base no escurecimento das amostras	82
Figura 35: Perfil de decomposição da HQ em creme a 30°C	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipologia da pele segundo a classificação de Fietzpatrick	3
Tabela 2: Classificação dos testes, de acordo com a finalidade	11
Tabela 3: Ensaio necessários para a validação do método analítico segundo a finalidade	12
Tabela 4: Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos	14
Tabela 5: Concentração dos componentes utilizados na preparação do creme base	23
Tabela 6: Média das concentrações de HQ em $\mu\text{g/mL}$ obtida para cada antioxidante utilizado	39
Tabela 7: Concentrações de HQ ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por espectrofotometria em UV – Vis	44
Tabela 8: Ensaio de linearidade	48
Tabela 9: Valores de precisão obtidos no ensaio de repetibilidade para HQ em creme	49
Tabela 10: Valores médios (n=3) obtidos na análise de precisão intermediária.....	51
Tabela 11: Médias dos valores de HQ obtidas no ensaio de recuperação.....	52
Tabela 12: Médias das concentrações (n = 3) obtidas no ensaio de exatidão	52
Tabela 13: Concentração de HQ remanescente após degradação acelerada a 65°C por 96 h.	55
Tabela 14: Valores obtidos a partir de três concentrações diferentes no teste de precisão, com respectiva média, desvio padrão e coeficiente de variação	59
Tabela 15: Valores para precisão intermediária (três concentrações diferentes/dois analistas/dias diferentes)	60
Tabela 16: Média dos valores de HQ em $\mu\text{g/mL}$ obtidos no ensaio de recuperação	61
Tabela 17: Valores das obtidos a partir de três concentrações diferentes	62
Tabela 18: Valores de precisão obtidos a partir de três concentrações diferentes de creme contendo HQ	68
Tabela 19: Valores obtidos a partir de três concentrações diferentes de HQ em creme por dois analistas em dias diferentes	69
Tabela 20: Valores de exatidão obtidos a partir do teste de recuperação	70
Tabela 21: Valores de concentração de HQ em $\mu\text{g/mL}$ obtidos no ensaio de recuperação	70

Resumo

RESUMO

O melasma é caracterizado por hipermelanose, adquirida, simétrica e irregular, situada em áreas da pele. Muitos trabalhos mostram a eficácia da hidroquinona (HQ) no processo de clareamento das manchas provocadas pelo melasma, sendo que esta já foi classificada como o despigmentante de pele mais prescrito do mundo. O maior inconveniente da HQ é que esta se oxida rapidamente, apresentando maior estabilidade em meio ácido, na faixa de 4,5 a 5,0. O estudo da estabilidade de formas farmacêuticas em geral, assegura que a forma farmacêutica se mantenha dentro dos limites estabelecidos durante o período em que garante a validade. Um fator relevante para a estabilidade é a garantia de que a fórmula não irá se oxidar. No caso da HQ, que é altamente instável por se oxidar facilmente, faz-se utilização de agentes antioxidantes, como o metabissulfito de sódio. Amostras de creme contendo 2% de HQ foram avaliadas por três metodologias diferentes (espectrofotometria com etanol como solvente; espectrofotometria de derivadas com ácido sulfúrico 0,1N como solvente e espectrofotometria de derivadas com metanol como solvente) em ensaios de estabilidade. Apenas a metodologia com metanol, mostrou-se adequada para a quantificação da HQ em ensaio de estabilidade. As metodologias com etanol e ácido sulfúrico não apresentaram eficácia. A partir da metodologia com metanol foram avaliados os sistemas antioxidantes e os prazos de validade foram determinados para as temperaturas de 45°C e 30°C. O ácido α lipóico promoveu melhor estabilidade para a HQ que o metabissulfito de sódio. O metabissulfito de sódio foi o antioxidante que melhor manteve as características iniciais do creme. O prazo de validade para a HQ sem antioxidante foi de 24 h, com metabissulfito de sódio foi de 87 h e com ácido α lipóico foi de 125 h à 45°C. Para a temperatura ambiente foi avaliado somente o creme sem antioxidante que apresentou prazo de validade de 72 h.

Palavras chave: validação de metodologia, ensaio de estabilidade, hidroquinona, metabissulfito de sódio, ácido α lipóico.

Abstract

ABSTRACT

Melasm is characterized as an acquired, symmetric and irregular hypermelanosis in the skin. Many works have shown the efficacy of hydroquinone (HQ), in the lighting process of melasm stains, and it has already been classified as the most prescribe skin lightning of the world. The major inconvenient of HQ is that it fastly oxides, showing more instability in acid media, in the range of 4.5 a 5.0. Stability studies of pharmaceuticals in general, ensure that the limits established during the shelf life can be kept. A very important factor for stability is the guarantee that the pharmaceutical will not oxide. As HQ is very instable for its fast oxidation, antioxidants as sodium metabissulfite are used. Cream samples with 2% of HQ were evaluated by three different methodologies (spectrophometric using ethanol as solvent, derivative spectrophotometric using sulfuric acid 0,1N as solvent and derivative spectrophotometric using methanol as solvent) in stability tests. Only the methodology with methanol had presented satisfactory results for quantification of HQ in stability tests. The methodologies with ethanol as well with sulfuric acid did not shown efficacy. From methanol methodology the antioxidants systems and the shelf life were evaluated for temperatures of 45°C and 30°C. Alpha lipoic acid promoted better HQ stability than sodium metabissulfite. Sodium metabissulfite was the antioxidant that best kept the initial characteristics of the cream. Shelf life for HQ without antioxidant was 24h, with sodium metabissulfite was 87h and with alpha lipoic acid was 125 h at 45°C. At 30°C it was evaluated only the sample with antioxidant which showed shef life of 72 h.

Key words: validation of methodology, stability test, shelf life, hydroquinone, sodium metabissulfite, alpha lipoic acid

Introdução

Hidroquinona (HQ)

A HQ (1,4-hidroxi-benzeno) é um hidroxifenol com formato de cristais finos e em forma de agulha. Possui solubilidade de 1:17 em água, 1:4 em álcool e 1:51 em clorofórmio. A massa molecular é de 110,11 e ponto de fusão entre 173 e 174°C. Sofre processo de oxidação acelerado em meio aquoso, principalmente em pH alcalino e mais retardado em pH ácido, entre 3 e 4,2 (BUDAVARI, 1996; USP 25, 2002). A representação da fórmula estrutural da HQ apresenta-se na figura 1.

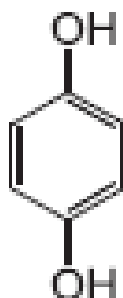


Figura 1: Fórmula estrutural da hidroquinona.

A ação despigmentante da HQ foi primeiramente observada em operários da indústria de borracha, que manuseavam monobenziléter de hidroquinona (ENGASSER e MAIBACH, 1981). A HQ inibe a enzima tirosinase, responsável pela hidroxilação da tirosina. Neste processo ocorre oxidação enzimática da tirosina à DOPA, promovendo assim a interrupção na síntese de melanina (PALUMBO et al., 1991).

A figura 2 mostra as etapas de formação de melanina. A melanina é sintetizada nos melanócitos com a participação da enzima tirosinase. Devido à ação desta enzima, o aminoácido tirosina é transformado primeiro em 3,4-diidroxifenilalanina. A tirosinase também age sobre a dopa, produzindo dopa-quinona, que após várias transformações converte-se em melanina. A tirosinase sintetizada é armazenada nos melanossomos. Quando a síntese de melanina

cessa, o melanossomo está repleto de melanina e perde então sua atividade tirosinásica, recebendo então o nome de grânulo de melanina.

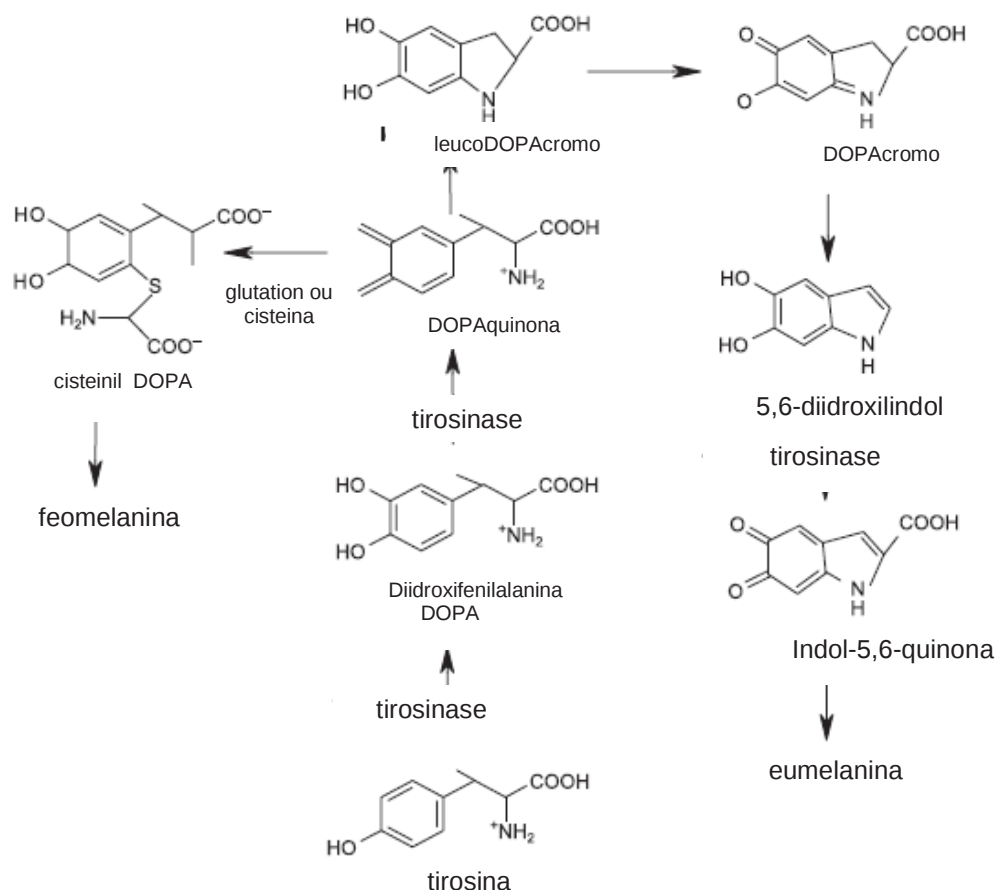


Figura 2: Representação esquemática da formação de melanina. Adaptado de (PARVEZ et al., 2006).

A cor da pele e sua tipologia, conforme Tabela 1, são dadas pela quantidade e localização de seus melanócitos, nos quais ocorrem reações enzimáticas e não enzimáticas da conversão de tirosina em melanina (PETIT, PIÉRARD, 2003; MAYENA, L. et al, 2004). Qualquer disfunção ou alteração na densidade destas estruturas resulta em uma desordem na formação da pigmentação normal da pele (PETIT, PIÉRARD, 2003).

Tabela 1: Tipologia da pele segundo a classificação de Fietzpatrick.

Fototipo	Histórico de queimadura solar e bronzeamento	Escurecimento por pigmentação	Grau de bronzeamento	Cor da pele não exposta	UV-A MED (mJ/cm)	UV-B MED (mJ/cm ²)
I	Queima facilmente, nunca bronzeia	Nenhum (-)	Nenhum (-)	Muito branca	20–35	15–30
II	Queima facilmente, bronzeia pouco	Fraco ± (± para +)	Mínimo para fraco (± para +)	Branca	30–45	25–40
III	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente e de maneira uniforme	Definido (+)	Baixo (+)	Branca	40–55	30–50
IV	Queima pouco, bronzeia moderadamente e facilmente	Moderado (++)	Moderado (++)	Bege-oliva, bronzeada	50–80	40–60
V	Raramente queima, bronzeia profundamente	Intenso (+++)	Intenso (+++)	Morena ou bronzeado	70–100	60–90
VI	Nunca queima, bronzeia profundamente	Intenso (+++)	Intenso (+++)	Morena escura ou negra	100	90–150

Adaptado de ASTNER e ANDERSON (2004)

As concentrações de HQ em cremes variam entre 1,5% e 4%. Concentrações de até 2% estão disponíveis em países como Estados Unidos e Brasil, em formulações de venda livre. Concentrações acima de 2% só são aviadas mediante prescrição médica. No tratamento do melasma é recomendado que o creme seja aplicado uniformemente nas áreas afetadas duas vezes ao dia. Uma melhora significativa pode ser observada após dois meses de tratamento, e então, é recomendada a suspensão do uso da HQ. (PETIT, PIÉRARD, 2003).

Contudo, em alguns casos, os resultados podem demorar até 6 meses para aparecer. Ressalta-se então a importância da atenção farmacêutica. O farmacêutico deve orientar ao paciente o modo de usar o creme e seus possíveis efeitos colaterais.

A reação mais freqüente dos pacientes usuários de HQ é irritação e sensibilização da pele, caracterizada por prurido e ardor, (KIM et al., 2007), embora estudos como o realizado por Westerhof e Kooyers (2005) indicam que a HQ, quando utilizada cronicamente pode originar danos ao DNA e conseqüente carcinogênese.

AMER e METWALLI (1998) testaram a eficácia de cremes contendo hidroquinona, garantindo que, em até 12 semanas, pacientes com áreas hiperpigmentadas pelo melasma e de pigmentação moderada caíram de 56% para apenas 2,1%, e pacientes com pigmentação grave decaíram de 44% para 8,4%, mostrando que o tratamento com creme de HQ teve boa resposta, atingindo a 89,5% dos pacientes com melasma, salientando ainda, os benefícios trazidos pela HQ para pacientes com problemas de pigmentação grave. Todavia deve-se destacar que este estudo não foi randomizado e controlado com placebo.

HURLEY et al. (2002) descobriram que a monoterapia de aplicação diária de creme contendo 4% de HQ, com aplicação diária de filtro solar, não apenas melhora o quadro do melasma, como também é tão efetivo como *peeling* quanto o ácido glicólico com HQ. Neste estudo randomizado, 21 mulheres espanholas foram tratadas com cremes de 4% de HQ e ácido glicólico (nas concentrações de 20% nas primeiras duas aplicações e 30% nas duas seguintes) em um lado da face e do outro lado foi aplicado apenas creme de HQ na concentração de 4%. Ambos os lados tiveram resultados de significância estatística, contudo, nos dois grupos não houve diferença estatística significativa quanto ao clareamento. Portanto, conclui-se que a HQ como mono terapia é o agente mais adequado para o tratamento do melasma.

Fármacos como a hidroquinona (HQ), que é um bifenol simples, estão sujeitos à degradação por mecanismos oxidativos. A presença de dois grupos hidroxila ligados ao anel em posição *para* aumenta a predisposição da reação de oxidação. A ativação de uma hidroxila contribui para a captação do par de elétrons pelo oxigênio, com a conseqüente liberação do próton hidrogênio e um elétron. Na seqüência da ressonância, o oxigênio da segunda hidroxila compartilha seu par de elétrons, facilitando a liberação do próton hidrogênio e um elétron, com a formação

da benzoquinona (BQ), conforme ilustrado na Figura 3 (FESSENDEN e FESSENDEN, 1998; MORRISON, 1994; SMITH e MARCH, 2001).

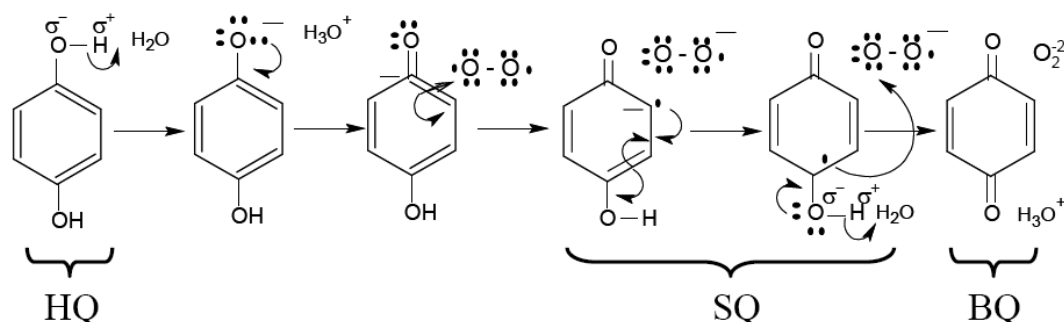


Figura 3: Oxidação da Hidroquinona. (FESSENDEN e FESSENDEN, 1998; MORRISON, 1994; SMITH e MARCH, 2001)

A HQ é um fármaco que se oxida facilmente para a forma de benzoquinona (BQ), que não possui atividade terapêutica. Esse inconveniente faz com que farmácias magistrais utilizem do recurso de *overage*, no qual um excesso de fármaco naturalmente instável é adicionado à formulação, com a finalidade de manter o conteúdo ativo dentro dos limites compatíveis com os terapêuticos durante seu prazo de validade, para compensar possíveis perdas do fármaco durante o período de armazenamento. Por outro lado, a HQ em altas concentrações é considerada tóxica (WESTERHOF e KOOYERS, 2005). Para evitar este tipo de recurso, outros tipos de sistemas antioxidantes podem ser incorporados à formulação, com a finalidade de melhorar a estabilidade da HQ. Essas substâncias podem sofrer degradação preferencial ou agir como inibidores de cadeias de radicais livres por apresentarem um potencial de oxidação menor que o fármaco (THOMPSON, 2006).

Para avaliar a eficácia do antioxidante, deve-se realizar um estudo de estabilidade da forma farmacêutica e quantificar o fármaco em tempos pré-determinados, verificando se o produto encontra-se alterado. Para isso, estes sistemas antioxidantes devem ser avaliados pelo ensaio de estabilidade

acelerada, no qual amostras são mantidas em estufa e submetidas a temperaturas mais elevadas, promovendo assim o aumento da velocidade de reação de oxidação da HQ.

A espectrofotometria eletrônica de absorção consiste na emissão de radiação sobre uma determinada amostra, a fim de medir a diferença da intensidade de radiação transmitida pela amostra em relação ao material de referência nos diversos comprimentos de onda da faixa espectral, que varia da região do ultravioleta (UV) 200-400nm até a região do visível (VIS) 400-760nm (MANDHAM et al., 2002).

Porém, quando se realiza um teste de estabilidade acelerado, no qual a substância foi submetida ao estresse oxidativo provocado pela temperatura, o produto da reação de decomposição deve ser considerado.

Paschoal et al (2003) descrevem que um dos problemas relacionados às leituras espectrofotométricas na região do UV-Vis de amostras multicomponentes é a sobreposição de bandas, no qual a banda de uma substância sobrepõe total ou parcialmente a banda de outra substância. Essa sobreposição reflete resultados falso-negativos, onde visivelmente, a oxidação ocorre, mas não consegue ser quantificada, mantendo-se ou até mesmo superando a mesma concentração inicial. Isto é o que acontece na determinação da HQ, que sofre interferência de seu produto de degradação (BQ) resultante do estresse oxidativo promovido pela elevação da temperatura.

Para eliminar este tipo de inconveniente e permitir a quantificação de uma substância na presença de outra, cuja absorbância ocorra no mesmo comprimento de onda, os espectros das duas substâncias podem ser sobrepostos e realizar a primeira derivada dos mesmos.

Contudo, em sistemas multicomponentes, ou até mesmo em sistemas submetidos ao estresse físico promovido no ensaio de estabilidade, a presença de um segundo componente com absorção próxima ao componente a ser quantificado interfere na seletividade do método. Nestes casos, o uso da derivação de espectrofotometria é uma alternativa para o aumento da seletividade do método. Espectros de primeira ordem (primeira derivada) promovem a

anulação no ponto referente ao comprimento de onda máximo (λ_{max}) do espectro de ordem zero, sendo positivo onde a absorção aumenta e negativo onde ela diminui. Portanto, uma curva diferencial de ordem n se anula n vezes, apresentando $(n + 1)$ bandas (PASCHOAL et al., 2003).

Assim, após a obtenção da curva de absorção de qualquer fármaco, é possível com a primeira derivada observar exatamente o comprimento de onda de maior absorção (ponto M), onde o valor da primeira derivada corresponde a zero (MANDHAM et al., 2002, PASCHOAL; FERREIRA, 2000; PASCHOAL et al., 2003).

Lopez-Garcia et al. (2005) descrevem uma metodologia para quantificação de HQ em géis e cremes utilizando a espectrofotometria de derivadas com comprimento de onda de 301 nm. Pela utilização da técnica de derivada de espectros, os autores sugerem o melhor ponto para a realização das leituras para quantificação da HQ em espectrofotômetro. Para isso obtiveram os espectros de primeira derivada dos placebos e de solução padrão de HQ. O ponto de leitura escolhido de 301nm é onde os placebos, tanto o gel quanto o creme, não interferem na absorção da HQ. Na figura 4 pode-se observar o ensaio de especificidade de LOPEZ-GARCIA e colaboradores (2005).

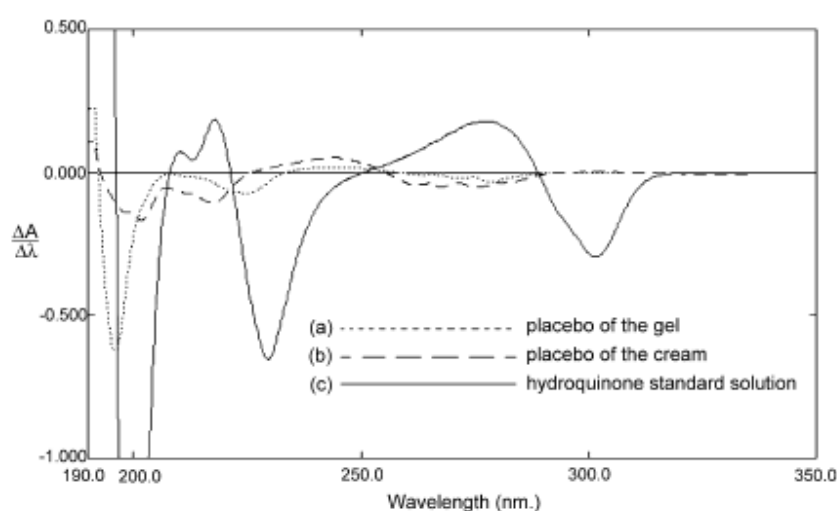


Figura 4: Ensaio de especificidade da HQ para os placebos (Lopes-Garcia et al., 2005).

Na Figura 4 encontra-se um gráfico de especificidade, onde são comparados os placebos de creme e géis a uma solução de HQ, para poder verificar se há interferência dos placebos no ponto de leitura da HQ. Tal avaliação é de fundamental importância para garantir que a leitura obtida seja o resultado somente da quantificação do analito.

Estudo de estabilidade

O teste de estabilidade tem como objetivo avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos que se alteram com o tempo, por influência de fatores ambientais como: a temperatura, a umidade e a luz. Além de estabelecer um período de contra prova para um fármaco ou estabelecer a vida útil para os medicamentos e condições de armazenamento recomendadas (BRASIL, 2002).

Este estudo visa aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações de características de forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento. Embora este estudo não substitua os procedimentos rigorosos exigidos nos testes de estabilidade, eles proporcionam um ganho de tempo considerável durante o processo de desenvolvimento do produto, identificando com rapidez as formulações que possuam estabilidade aceitável (ADAMIS et al., 2004).

O estudo da estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto. Empregam-se condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características do produto, auxiliando na triagem das formulações (BRASIL, 2002). Embora a maioria dos processos de degradação não promovam alterações ou rearranjos moleculares que sejam visivelmente observáveis, algumas reações podem apresentar mudança na coloração e formação de precipitados (GIL & BAPTISTA FILHO, 2005).

A degradação termolítica é caracterizada pela exposição a altas temperaturas, que possam clivar as ligações da molécula, seja por hidrólise ou oxidação. Estudos como o de aceleração da reação de decomposição pela elevação da temperatura são utilizados para a construção do gráfico de Arrhenius, que prevê a taxa de degradação em diferentes temperaturas. A relação de Arrhenius é a expressão mais comumente utilizada para avaliar a relação entre as taxas de reação e temperatura para uma determinada ordem de reação.

O estudo da estabilidade de fármacos é considerado etapa determinante no controle de qualidade de formas farmacêuticas. Caracteriza-se pela capacidade da formulação em manter suas especificações em um sistema fechado com recipiente específico, garantindo que a potência rotulada, suas propriedades físicas e organolépticas não sejam alteradas, mantendo-se de acordo com o nível pré-determinado pelo fabricante (VADAS, 2004).

Com a finalidade de reduzir o tempo do estudo de estabilidade, fatores que aceleram a decomposição podem ser empregados, como o estresse físico causado pelo aumento de temperatura. De modo geral, a velocidade da reação de degradação por oxidação de um fármaco duplica ou triplica para cada 10°C de aumento de temperatura. Esse aumento de temperatura pode também provocar evaporação da água contida no creme, por este motivo, o sistema deve ser mantido fechado (FERREIRA, 2002).

Para formulações contendo HQ, a estabilidade pode ser acompanhada pela análise visual do produto. O escurecimento do produto é diretamente proporcional à extensão da reação de oxidação da HQ em BQ (CONNORS, 1986; ENGASSER e MAIBACH, 1981). Contudo o fármaco deve ser quantificado para que se possa conhecer realmente seu prazo de validade e garantir a qualidade do produto comercializado.

A quantificação de fármacos como a HQ pode ser realizada por várias metodologias, como espectrofotometria convencional, espectrofotometria de derivada e cromatografia líquida de alta eficiência. Porém, a quantificação torna-se difícil em ensaios de estabilidade, uma vez que deve-se observar a formação de produtos de degradação que interfere na análise como citado anteriormente.

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser avaliada considerando que, uma vez que conhecidos os principais fatores de degradação, eles podem ser utilizados para acelerar a reação e estipular o prazo de validade do produto (BAKSHI, SINGH, 2002; LACHMAN, 2001).

Determinação do prazo de validade

O prazo de validade é caracterizado como o período no qual um determinado produto mantenha-se estável. Essa estabilidade considera que não haja degradação do princípio ativo em mais de 10%, ou até em 15% em alguns casos. Define-se prazo de validade, então, como o período máximo em que um medicamento, após sua preparação, não apresente decomposição dos princípios ativos em porcentagens superiores as pré determinadas.

Uma vez que se determina a ordem da reação e a velocidade específica de degradação, torna-se simples estabelecer o prazo de validade do medicamento, utilizando-se de artifícios matemáticos, conforme as equações a seguir, nas quais devem aplicar-se, respectivamente, para zero ordem (equação 1), para primeira ordem (equação 2) e para segunda ordem (equação 3).

$$PV = \frac{Co - C}{K} \quad (\text{equação 1})$$

$$PV = \frac{2,303}{K} \times \log \frac{Co}{C} \quad (\text{equação 2})$$

$$PV = \frac{Co - C}{Co \times C \times K} \quad (\text{equação 3})$$

Nas quais:

PV é o prazo de validade, Co é a concentração inicial de fármaco, C é a concentração final do fármaco (conforme estabelecido, 90 ou 85%) e K as velocidades específicas de reação.

Validação de metodologia analítica.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise.

Para a realização da validação de metodologias analíticas, a ANVISA (BRASIL, 2003) sugere quatro categorias e os ensaios necessários para cada uma delas, conforme as Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Classificação dos testes, de acordo com a finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos e matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

(BRASIL, 2003)

O presente trabalho se enquadra na categoria I, pois, mesmo apresentando produto de degradação no ensaio de estabilidade, toda a quantificação é voltada em torno do princípio ativo HQ.

Tabela 3: Ensaios necessários para a validação do método analítico segundo a finalidade.

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

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

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.(BRASIL, 2003)

Portanto, conforme exposto na Tabela 3 os ensaios a serem realizados são de especificidade, linearidade, intervalo, precisão tanto repetibilidade, quanto intermediária, exatidão e robustez.

A seguir estão listados os conceitos de cada parâmetro a ser avaliado, de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003):

Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 3. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$.

Intervalo de confiança

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 4). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Tabela 4: Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

(BRASIL, 2003)

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

1. Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

2. Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

3. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou como o coeficiente de variação (CV%) de uma série de medidas. A equação 4 refere-se ao CV%:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{média}} \times 100 \text{ (equação 4)}$$

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

- Na análise de uma amostra, na qual uma quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);
- Nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão (E) é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a equação 5:

$$E = \frac{C_{Me}}{C_t} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

na qual: CMe é a concentração média experimental e Ct é a concentração teórica

Recuperação

O ensaio de recuperação visa garantir que o analito seja analisado na totalidade de sua massa presente na amostra, determinando a eficácia do método,

uma vez que, ao receber qualquer tipo de tratamento de análise, como a diluição, por exemplo, a perda do analito durante o ensaio deve ser calculada experimentalmente. Com o fator de recuperação, o resultado fica mais próximo da realidade analítica. O fator de recuperação é obtido pela diferença entre o produto com analito e o produto sem o analito adicionado (LEITE, 2002).

Com estas ferramentas de validação e a necessidade do estudo da estabilidade da HQ, neste trabalho várias metodologias foram estudadas, avaliadas e modificadas para dar origem a uma nova metodologia que satisfaça a necessidade de quantificar a HQ na presença de seu produto de degradação, BQ, durante os ensaios de estabilidade

Objetivos

Objetivos

Objetivo Principal

Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de HQ em presença de seu produto de degradação BQ durante testes de estabilidade.

Objetivos Secundários:

- Estudo de estabilidade de cremes contendo HQ.
- Avaliação da eficácia de diversos antioxidantes.
- Determinação de prazo de validade de cremes contendo HQ.

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1. Material

3.1.1. Solventes, reagentes e soluções

Ácido sulfúrico - Synth

Álcool etílico - Synth

Metanol – Quimex

Hidroquinona – Hidroquisan – hidroquinona grau farmacêutico (Juk)

Benzoquinona PA – GMBH&CO MÜNCHEN

Palmitato de isopropila - CRODA

Propilglicol

Álcool cetoestearílico - CRODA

Imidazolinidil uréia

Tetraisopalmitato de ascorbila -VC IP – Nikkol

Ácido α lipóico

Metabissulfito de sódio

3.1.2. Equipamentos e instrumentos

Balança analítica METTLER – mod. H-51

Balança semi-analítica GEHAKA – mod. BG-1000

Centrífuga SORVALL – mod. TC6 com rotor H400 ($r = 14,9$ cm)

Espectrofômetro UV-Vis HP – mod. 8453

Equipamento de ultrapurificação de água Milli-Q Plus

Peagômetro MICRONAL – mod. B-474

Agitador magnético FISATOM – mod. 706

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação do creme base

O creme utilizado como base para a incorporação da HQ foi elaborado conforme BOLDRINI (2005) e tem seus componentes e concentrações descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Concentração dos componentes utilizados na preparação do creme base.

Componentes		[] %
Nome Químico	Nome Comercial	
álcool cetosteárilico e álcool cetosteárilico 20 OE	Cosmowax	12,0
palmitato de Isopropila	Crodamol IPP	2,0
propilenoglicol	Propilenoglicol	3,0
imidazolidiniil uréia	Germal 115	0,2
água ultrapura	água Milli Q	q.s.p. 100

1 – Os componentes foram pesados em balança semi-analítica e aqueceu-se separadamente a fase aquosa e a fase oleosa até atingirem 75°C.

2 – Quando a temperatura foi atingida, verteu-se a fase aquosa na oleosa sob agitação até o resfriamento do creme.

3 – O pH foi corrigido para 5,3 com solução de ácido cítrico (10%).

3.2.2. Estabilidade preliminar

Para o ensaio de centrifugação, foram pesados 5,0 g do creme base e colocados em tubos de centrífuga, nas seguintes condições experimentais:

Temperatura: 30°C ± 2°C

Velocidade : 3000 rpm

Rotor: H400 (r = 14,9 cm)

Tempo: 30 minutos

Após a realização da centrifugação, as amostras foram analisadas macroscopicamente a fim de observar separação de fases e foram classificadas de acordo com normas especificadas pela ANVISA (BRASIL, 2004):

- i. **M** para amostra modificada
- ii. **N** para amostra normal, sem separação de fases ou alterações em seu aspecto

As amostras foram realizadas em triplicata.

O teste de estabilidade preliminar foi realizado em triplicata e as leituras foram feitas no final de cada um dos 6 ciclos propostos. Cada um dos ciclos indicados para as leituras é composto de 24 h de exposição da amostra em estufa a 45°C e 24 h de exposição a freezer em temperatura s de -2°C (ANVISA, 2004). As leituras foram realizadas nos tempos: 0 h, 48 h, 72 h, 120 h, 168 h e 264 h.

3.2.3. Quantificação da HQ em creme

3.2.3.1. Álcool etílico.

Foram preparados 50,0 g de creme base para cada um dos sistemas antioxidantes propostos. O controle negativo é composto do creme com 2% de HQ manipulado em local com pouca iluminação, sem qualquer tipo de sistema antioxidante.

Como sistemas antioxidantes foram propostos:

- O metabissulfito de sódio, que será o controle positivo nos testes de estabilidade

- O VC IP que será o antioxidante testado no teste de estabilidade

A HQ e os antioxidantes foram pesados e previamente solubilizados com propilenoglicol. O creme preparado com o respectivo sistema antioxidante, foi adicionado à HQ em escala geométrica, a fim de otimizar a incorporação

Foram preparadas amostras do controle negativo (somente HQ, sem qualquer tipo de antioxidante), controle positivo (utilizando metabissulfito de sódio nas concentrações: 0,1%; 0,5%; 1%; 2%) e VC-IP nestas mesmas concentrações.

Os cremes foram acondicionados em potes plásticos opacos, fechados com tampa de rosca e tubos de ensaio para a realização do teste visual.

A varredura foi avaliada através da análise em espectrofotômetro do comprimento de onda de absorção máxima (λ máx) da HQ em etanol. Foi preparada, em triplicata, solução estoque de HQ (100,0 $\mu\text{g/mL}$) álcool etílico. Da solução estoque foi retirada uma alíquota de 20,0 μL e adicionada em cubeta de quartzo contendo 2,0 mL de álcool etílico. As soluções foram avaliadas na faixa espectral de 200 a 400 nm.

3.2.3.1.1. Estabilidade acelerada

Transferiu-se 1,0 g do creme HQ 2% para o balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se o volume para 10,0 mL com álcool etílico. Procedeu-se agitação em banho de ultrassom, por 3 minutos. Transferiu-se essa solução para o tubo de centrífuga. Centrifugou-se a amostra por 5 minutos a 3500 rpm (rotor 400 com raio de 14,9 cm). A leitura do sobrenadante foi realizada em triplicata, em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 294 nm.

Este ensaio tem como objetivo avaliar a degradação da HQ a 45°C e 65 °C. As diluições foram realizadas colocando 10,0 μL em 2,0 mL de álcool etílico diretamente na cubeta. Após leve agitação as amostras foram lidas em espectrofotômetro no λ de 294 nm. Para a temperatura de 45°C, as amostras foram realizadas no tempo inicial, 48 h, 72 h, 120 h, 168 h e 264 h. Para a temperatura de 65°C as leituras foram feitas a cada 2 h. Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

Análise Visual

Cerca de 10,0 g de cada creme contendo 2% de HQ, com as respectivas concentrações dos antioxidantes propostos foram colocados em tubos de ensaio, fechados com filme plástico e armazenados em estufa na temperatura de 45°C. Fotografias dos cremes nos tempos 0 h, 72 h e 264 h foram feitas para mostrar visualmente a degradação visual da HQ. Os tubos foram cobertos com filme plástico para evitar a evaporação da água devido ao aumento da temperatura na estufa

3.2.3.1.2. Validação da metodologia.

Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio da curva analítica e tratamento estatístico pertinente realizado pela regressão linear por através dos mínimos quadrados cujas determinações foram feitas em triplicata para cada concentração.

Foram pesados em balança analítica exatamente 5,0 mg de HQ e transferidos para balão volumétrico de 50,0 mL, obtendo-se assim, uma solução de HQ em álcool etílico de concentração de 100 µg/mL, denominada solução estoque. A curva analítica foi obtida através de diluições seriadas desta solução estoque. Alíquotas 10,0 µL, 20,0 µL, 30,0 µL, 40,0 µL, 50,0 µL, 60,0 µL e 70,0 µL desta solução estoque foram adicionadas a 2,0 mL de álcool etílico diretamente na cubeta. Como branco foi utilizado o solvente e as amostras foram obtidas em espectrofotômetro no comprimento de onda λ de 294 nm.

Para cada concentração foram calculados a média e o desvio padrão, obtendo-se o intervalo das concentrações da HQ e a linearidade. A avaliação do gráfico foi realizada por regressão linear.

Precisão

Foram pesados em béquer exatamente 0,5 g de creme com 2% de HQ (correspondente a 10,0 mg de HQ). Adicionou-se quantidade de álcool etílico suficiente para dissolver o creme. A solução foi transferida para balão volumétrico

de 100,0 mL e o volume foi completado com álcool etílico, resultando em uma solução de 100 µg/mL de HQ denominada solução estoque.

Conforme ANVISA (2003), a precisão foi considerada em dois níveis:

Repetibilidade

A partir da solução estoque foram transferidos 10, 40 e 70 µL, a 2,0 mL diretamente na cubeta correspondentes respectivamente as concentrações de 0,4975, 1,9607 e 3,3816 µg/mL da curva analítica. As amostras foram realizadas em triplicata e foram analisadas em espectrofotômetro de UV-Vis. no comprimento de onda de 294 nm.

Precisão intermediária

A partir da solução estoque foram transferidos 10, 40 e 70 µL, correspondentes respectivamente as concentrações da curva analítica a 2,0 mL diretamente na cubeta. Cada amostra foi realizada por dois analistas diferentes em dois dias diferentes. As amostras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro de UV-Vis no comprimento de onda de 294 nm.

A precisão foi calculada através do coeficiente de variação das amostras, conforme equação 4.

Exatidão e recuperação

Foi pesado exatamente 0,5 g do creme com HQ a 2% em béquer. Adicionou-se quantidade suficiente de álcool etílico para a solubilização e transferiu-se esta solução para balão volumétrico de 100,0 mL. Completou-se o volume com álcool etílico e procedeu-se agitação em banho de ultrasom até a completa solubilização do creme, obtendo-se assim uma solução de HQ com concentração de 100,0 µg/mL. A solução obtida foi centrifugada por 5 minutos em 3500 rpm, utilizando rotor H400 com raio de 14,9 cm. Para o ensaio de exatidão, foram coletadas e analisadas alíquotas de 10, 30 e 70 µL do sobrenadante. As

alíquotas foram transferidas para cubeta contendo 2,0 mL de álcool etílico. Para o ensaio de recuperação, foram coletadas e analisadas alíquotas de 10, 40 e 60 µL do sobrenadante. Essas alíquotas foram transferidas para cubeta contendo 2,0 mL de álcool etílico e 10 µL de uma solução padrão de HQ. Para a preparação da solução padrão de HQ foram pesados 5,0 mg de HQ que foram solubilizados em álcool etílico e posteriormente transferidos para balão volumétrico de 50,0 mL, completando-se o volume com álcool etílico, correspondentes respectivamente às concentrações teóricas de 0,9900 µg/mL; 2,4390 µg/mL e 3,3816 µg/mL da curva analítica. Agitou-se a cubeta com cuidado e procedeu-se a leitura das absorbâncias a 294 nm no espectrofotômetro. Os valores de exatidão foram obtidos através da equação 5. A ANVISA considera o método exato para variações de até 5%.

3.2.3.2. Ácido sulfúrico 0,1N

Para caracterizar o ponto de *zero crossing*, espectros de HQ e BQ a 18 µg/mL foram obtidos através da técnica de varredura em primeira derivada em espectrofotômetro de UV na faixa espectral de 200 a 400 nm.

Para determinar o melhor ponto de leitura da HQ em presença de BQ, construiu-se gráfico de curva analítica para cada um dos comprimentos de onda considerados adequados a leitura.

3.2.3.2.1. Estabilidade acelerada

Para avaliar se esta metodologia é adequada para ensaios de estabilidade acelerada com cremes contendo HQ, os testes foram realizados somente com cremes contendo apenas HQ sem qualquer tipo de sistema antioxidante. Para cada amostra de antioxidante foram preparados 50,0 g de creme a 2% de HQ que foi acondicionado em frascos plásticos com tampa de rosca. O creme foi submetido à temperatura de $65 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa.

O ensaio teve duração de 96 h, sendo que o tempo de leitura de cada amostra foi de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 96 h. Em cada um dos tempos determinados, pesou-se exatamente 0,6 g de creme, correspondente a 15,0 mg de HQ, em béquer, adicionou-se cerca de 5,0 mL de ácido sulfúrico 0,1N, previamente preparado, através da diluição de 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado para 1,0 L de água ultrapura e padronizado conforme literatura (MORITA, 1972), lentamente, procedendo agitação com bastão de vidro. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com o solvente, resultando em uma solução de 120 $\mu\text{g/mL}$. Desta solução, uma alíquota de 3,75 mL foi transferida para balão de 25,0 mL a fim de obter-se a concentração de 18 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.3.2.3. Validação da Metodologia

Linearidade:

A curva de analítica foi obtida a partir de cinco concentrações de soluções de HQ (10-26 $\mu\text{g/mL}$). A linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear, com determinações realizadas em triplicata para cada nível de concentração.

Pesou-se 50,0 mg de HQ que foram solubilizados em béquer com ácido sulfúrico 0,1N. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e completou-se o volume com ácido sulfúrico, obtendo-se assim uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, denominada “solução estoque”.

A partir da solução estoque, diluições foram realizadas em balões volumétricos de 25,0mL, completando-se o volume com ácido sulfúrico 0,1N para obtenção das seguintes concentrações teóricas: 10 $\mu\text{g/mL}$, 14 $\mu\text{g/mL}$, 18 $\mu\text{g/mL}$, 22 $\mu\text{g/mL}$, 26 $\mu\text{g/mL}$.

Precisão

Foram pesados 0,5 g de creme contendo 2% de HQ em béquer. Ao creme foi adicionado quantidade suficiente de ácido sulfúrico 0,1N. Esta solução foi

transferida para balão volumétrico de 100,0 mL, resultando em uma solução de HQ 100 µg/mL, denominada solução estoque.

Repetibilidade

A partir da solução estoque foram transferidos 0,25; 0,45 e 0,65 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, completando o volume com ácido sulfúrico 0,1N, obtendo-se respectivamente as concentrações de 10, 18 e 26 µg/mL. As amostras foram realizadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de UV-Vis. no comprimento de onda de 230 nm.

Precisão intermediária:

A partir da solução estoque foram transferidos 0,25; 0,45 e 0,65 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, obtendo-se respectivamente as concentrações de 10, 18 e 26 µg/mL. Cada amostra foi realizada por dois analistas diferentes em dois dias diferentes. As amostras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro de UV-Vis. no comprimento de onda de 230 nm.

A precisão foi calculada pelo CV%, conforme a equação 4, citada anteriormente.

Exatidão e recuperação

Uma quantidade de creme de exatamante 600,0 mg correspondente a 12,0 mg de HQ foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL e dissolvidos em ácido sulfúrico 0,1N, obtendo-se assim uma solução de 120 µg/mL. Alíquotas de 10,0 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL contendo respectivamente 1,0; 5,0 e 10,0 mL de solução padrão de HQ de 100 µg/mL. Ácido sulfúrico 0,1N foi adicionado para completar o volume, obtendo-se assim concentrações teóricas de 13,2; 18,0 e 24 µg/mL. Todas as

amostras foram realizadas em triplicata. A exatidão foi calculada conforme a equação (5).

Pesquisa de interferentes

O ensaio de especificidade foi realizado com a análise de placebos, na qual amostras somente do creme base, sem a HQ, foram analisadas. Este sistema de resposta foi utilizado a fim de examinar se há interferência de sobreposição de bandas que comprometa a quantificação da HQ

3.2.3.3. Metanol

Primeiramente, identifica-se o ponto de *zero crossing* da BQ. Para isso, soluções de mesma concentração (18µg/mL) de HQ e BQ foram preparadas e analisadas em espectrofotômetro em primeira derivada da absorbância utilizando a da técnica de varredura, com variação de comprimento de onda de 200 a 400 nm.

Preparou-se amostras de HQ e BQ, ambas na concentração de 18 µg/mL. Pesou-se 0,45 mg de HQ e de BQ, separadamente, que foram transferidos para béqueres de 10,0 mL e solubilizados em metanol. Transferiu-se as soluções para balões de 25,0 mL e completou-se o volume com metanol. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e analisadas no espectrofotômetro em primeira derivada da absorbância. Os espectros foram sobrepostos para identificar o ponto de *zero crossing* da BQ.

3.2.3.3.2. Validação da metodologia

Linearidade

Pesou-se 5,0 mg de HQ, que foram transferidos para um béquer de 50,0 mL. Adicionou-se então metanol em quantidade suficiente para solubilizar a HQ. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL, a fim de obter-se a concentração de 100 µg/mL, denominada solução padrão. As amostras foram realizadas em triplicata.

Diluições foram feitas a partir da solução padrão para obter-se as concentrações de 6, 8, 10, 12 e 14 µg/mL.

As amostras foram analisadas pelo método de espectrofotometria ultravioleta de primeira derivada, em comprimento de onda de 271 nm.

O gráfico foi obtido com a relação entre as concentrações de HQ e valores obtidos nas 1ª derivadas das absorbâncias. A avaliação foi feita pelo método de regressão linear.

Precisão

Foram pesados 0,5 g de creme contendo 2% de HQ em béquer. Ao creme foi adicionado quantidade suficiente de metanol. Esta solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL, resultando em uma solução de 100 µg/mL, denominada solução estoque.

Repetibilidade:

A partir da solução estoque foram transferidos 0,25; 0,45 e 0,65 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, obtendo-se respectivamente as concentrações de 10, 18 e 26 µg/mL. As amostras foram realizadas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de UV-Vis. no comprimento de onda de 271 nm.

Precisão intermediária:

A partir da solução estoque foram transferidos 0,25; 0,45 e 0,65 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, obtendo-se respectivamente as concentrações de

10, 18 e 26 $\mu\text{g/mL}$. Cada amostra foi realizada por dois analistas diferentes em dois dias diferentes. As amostras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro de UV-Vis. no comprimento de onda de 271 nm.

A precisão foi calculada através do coeficiente de variação das amostras, conforme equação 4.

Exatidão e recuperação

Para a preparação da solução estoque de 100 $\mu\text{g/mL}$ de HQ, pesou-se exatamente cerca de 5,0 mg de HQ que foram diluídos em quantidade suficiente de metanol para a solubilização. Transferiu-se esta solução para balão volumétrico de 50,0 mL, obtendo-se então a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Pesou-se exatamente cerca de 600,0 mg de creme, correspondente a 12,0 mg de HQ, que foi diluído com quantidade suficiente de metanol para a dissolução do creme. Essa solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL, a fim de obter-se uma solução de HQ a 120 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas de 5,0 mL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 5,0 mL contendo respectivamente 0,5; 2,5; e 5,0 mL de solução estoque 100 $\mu\text{g/mL}$ de HQ. As amostras foram analisadas em 271 nm. A exatidão foi calculada conforme a equação 5.

3.2.3.3.1. Estabilidade acelerada

Pesou-se exatamente 100,0 mg de creme com 2% HQ em béquer de 10,0 mL. Adicionou-se 5,0 mL de metanol. Esta solução foi agitada com bastão de vidro e filtrada em papel de filtro para balão volumétrico de 50,0 mL, completando o volume com metanol. Desta solução pipetaram-se 2,5 mL que foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com metanol.

Para a realização do ensaio de estabilidade acelerada, os cremes contendo sistemas antioxidantes compostos de metabissulfito de sódio 0,1%, ácido α lipóico 5% e somente HQ sem qualquer tipo de sistema antioxidante foram armazenados em estudos e submetidos a diferentes temperaturas.

Estabilidade acelerada à 55°C

Para a realização do ensaio de estabilidade acelerada, os cremes contendo sistemas antioxidantes compostos de metabissulfito de sódio 0,1%, ácido α lipóico 5% e somente HQ sem qualquer tipo de sistema antioxidante foram submetidos a 55°C armazenados em estufas durante aproximadamente 150 h.

Avaliação visual

Fotografias dos cremes submetidos a 55°C foram feitas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h.

Estabilidade acelerada à 45°C

Para a realização do ensaio de estabilidade acelerada, os cremes contendo sistemas antioxidantes compostos de metabissulfito de sódio 0,1%, ácido α lipóico 5% e somente HQ sem qualquer tipo de sistema antioxidante foram submetidos a 45°C armazenados em estufas durante aproximadamente 900 h.

Avaliação visual

A realização da avaliação visual da decomposição da HQ permite avaliar qualitativamente o grau de decomposição da HQ através do escurecimento gradativo que a BQ oferece. Fotografias dos cremes submetidos a 45°C foram feitas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 168, 192, 216, 312 e 900 h.

Estabilidade à temperatura ambiente

Para a realização do ensaio de estabilidade à temperatura ambiente (30°C), os cremes contendo apenas HQ sem antioxidante foram armazenados à 30°C. As leituras foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 17, 21, 24 e 28 dias.

Resultados

4. Resultados e discussão

Preparação do creme base

Para a realização dos ensaios previstos no estudo de estabilidade, a HQ foi incorporada ao creme base. A formulação que melhor se adequou para a incorporação da HQ, baseado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório (BOLDRINI, 2005) é bem simplificada, diminuindo a possibilidade de interferência dos componentes.

De acordo com YOUN e colaboradores (2006), o pH da pele da face é de 5,3. Usou-se ácido cítrico para ajustar o pH do creme e todos os testes foram realizados com o creme nesta faixa de pH. Por isso a HQ e os antioxidantes foram umedecidos previamente com propilenoglicol. SILVA e LIMA (2005) afirmam que a solubilização da HQ em propilenoglicol a torna mais estável que quando a solubilização é feita com etanol, uma vez que o propilenoglicol tem a propriedade de manter o pH da formulação estável enquanto o etanol tende a torná-lo mais ácido. Uma vez que a HQ esteja em pH muito diferente de seu pH de máxima estabilidade, reações como a de oxidação podem ser fomentadas, além do pH muito ácido inviabilizar o uso tópico do creme. Os antioxidantes foram incorporados ao creme base. Após trituração e solubilização da HQ em propilenoglicol, o creme, contendo os respectivos antioxidantes foi transferido para o gral em escala geométrica.

Para serem expostos a temperaturas elevadas nos ensaios de estabilidade, os cremes foram acondicionados em frascos plásticos com tampa de rosca, para impedir a evaporação da água.

Estabilidade preliminar

Após a centrifugação, o creme não apresentou separação de fases, classificando-se a amostra como **N** segundo as normas especificadas pela ANVISA (BRASIL, 2003), o que indica que o creme escolhido possui boas

condições físicas de estabilidade para a realização dos testes de estabilidade do fármaco.

Quantificação da HQ em creme

Álcool etílico

Esta metodologia foi estudada previamente em nosso laboratório para a quantificação de cremes contendo o complexo de HQ e β -ciclodextrina. Os ensaios foram refeitos sem o complexo de inclusão para a quantificação de HQ remanescente no ensaio de estabilidade, a fim de avaliar se a metodologia era viável para este tipo de estudo.

Os resultados obtidos nos ensaios propostos nesta metodologia, que utiliza o álcool etílico como solvente, foram avaliados por espectrofotometria na região de UV-Vis. Foi feita uma varredura em toda a faixa espectral para identificar o pico de máxima absorção para a HQ. Na Figura 5 pode-se observar que o pico de absorção máxima da HQ em álcool etílico é de 294 nm. O resultado observado confirma os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório bem como o descrito na literatura (USP 25, 2002). A partir deste resultado, as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 294 nm.

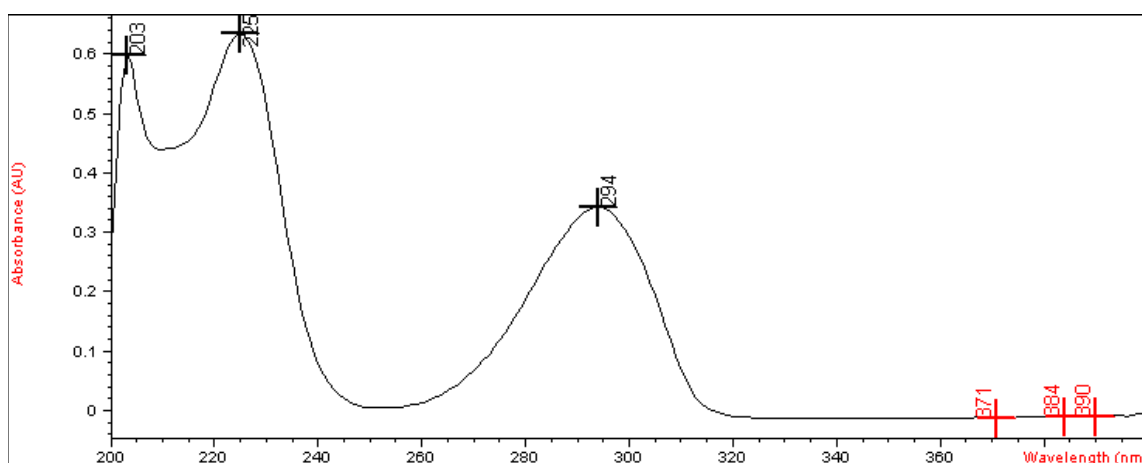


Figura 5: Determinação do pico de máxima absorção da HQ em álcool etílico

Estabilidade acelerada

O efeito da temperatura sobre uma reação de decomposição permite prever a estabilidade de produtos, em condições normais de prateleira, a partir de resultados obtidos nos ensaios de estabilidade acelerada.

De acordo com Lachman et al. (2001), a velocidade de uma reação química praticamente duplica a cada 10°C de aumento de temperatura. Porém, algumas reações não são afetadas significativamente, enquanto outras apresentam alterações significativas. Recomenda-se, assim, a elaboração de um protocolo de teste de estabilidade para cada formulação.

Estabilidade acelerada a 45°C

Na Tabela 6, encontram-se os valores de concentração obtidos em cada intervalo de tempo proposto a 45°C para cada sistema antioxidante estudado. Cada amostra foi avaliada em triplicata e as médias foram consideradas.

Tabela 6: Médias das concentrações de HQ em $\mu\text{g/mL}$ obtida para cada antioxidante utilizado.

	<i>Concentração de HQ ($\mu\text{g/mL}$) em cada tempo (h)</i>					
	0	48	72	120	168	264
HQ	0,5345	0,4307	0,4702	0,4475	0,4175	0,4394
Met 0,1%	0,5283	0,4904	0,4754	0,4835	0,481	0,4939
Met 0,5%	0,512	0,4475	0,471	0,4977	0,4435	0,4870
Met 1%	0,5205	0,4124	0,4375	0,4641	0,4586	0,4628
Met 2%	0,5256	0,4601	0,4809	0,4734	0,4949	0,5029
VC-IP 0,1%	0,4939	0,5092	0,5168	0,4945	0,483	0,4337
VC-IP 0,5%	0,4897	0,5072	0,5028	0,5032	0,4827	0,4332
VC-IP 1%	0,5032	0,4944	0,4858	0,4883	0,4733	0,3937
VC-IP 2%	0,5044	0,4938	0,5067	0,853	0,486	0,4030

HQ : hidroquinona

Met: antioxidante - metabissulfito de sódio

VC IP : antioxidante- tetraisopalmitato de ascorbila

Pode-se observar que mesmo após 264 h a 45°C, os valores de concentração de HQ remanescente quantitativamente determinada por espectrofotometria em UV- Vis em todos os cremes não se alteraram significativamente. Contudo, as amostras contendo somente HQ ou HQ com VC IP apresentavam-se com coloração amarronzada, característica da oxidação do fármaco. O mesmo não ocorreu com o creme que continha metabissulfito de sódio como antioxidante.

As Figuras 6 e 7 ilustram a variação da concentração de HQ em função do tempo de exposição de cada amostra ao estresse físico provocado pelo aumento da temperatura em função do tempo. No gráfico **a** está ilustrado as concentrações de HQ obtidas sem antioxidante em cada um dos tempos de leitura. Nos gráficos de **b** a **e** encontra-se a HQ adicionada de metabissulfito nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1% e 2%, respectivamente, e nos gráficos de **b** a **e** da Figura 6 encontra-se a HQ adicionada de VC IP nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1% e 2%, respectivamente.

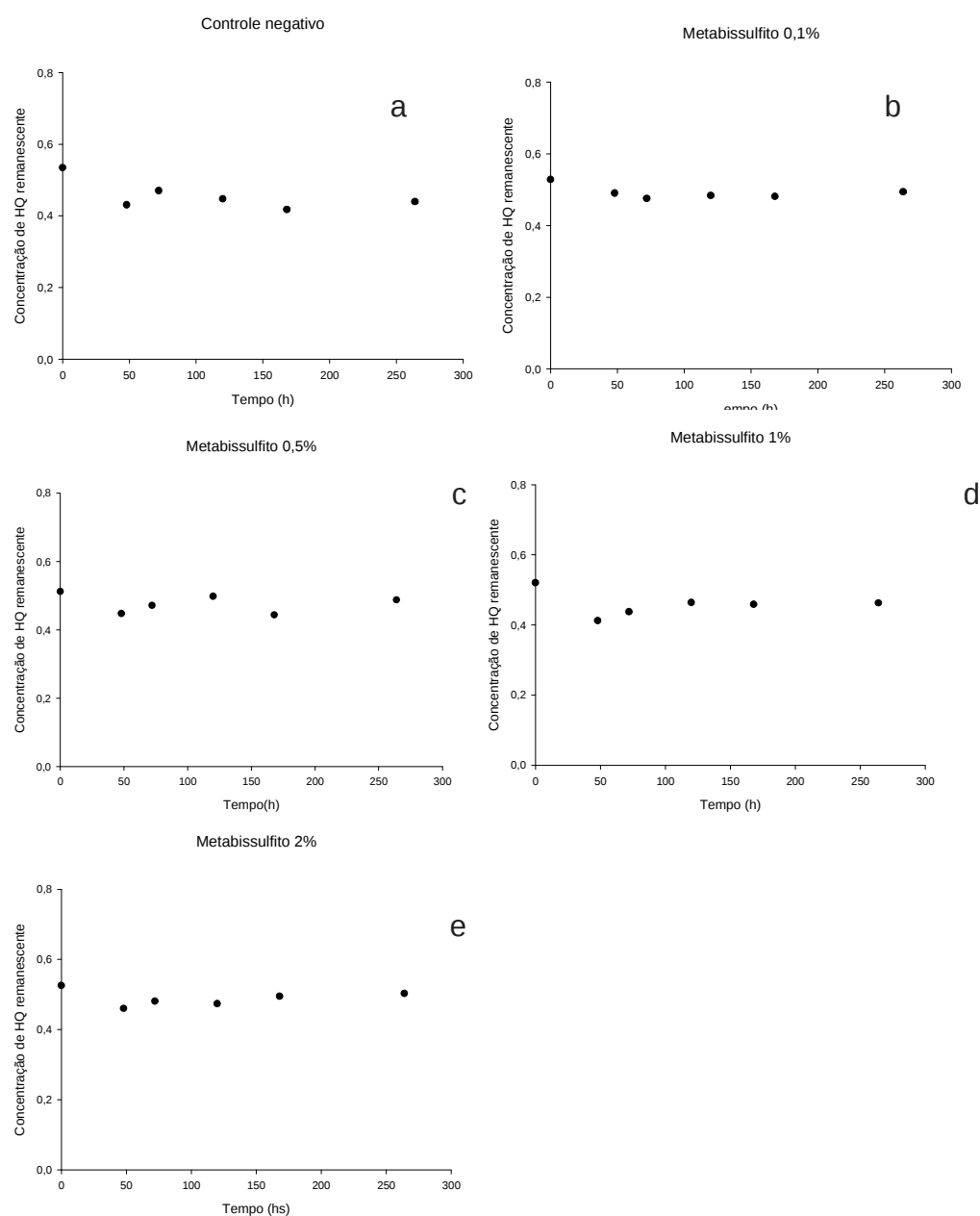


Figura 6: Comparação da degradação da HQ sem antioxidante e com metabissulfito em ensaio de estabilidade a 45°C.

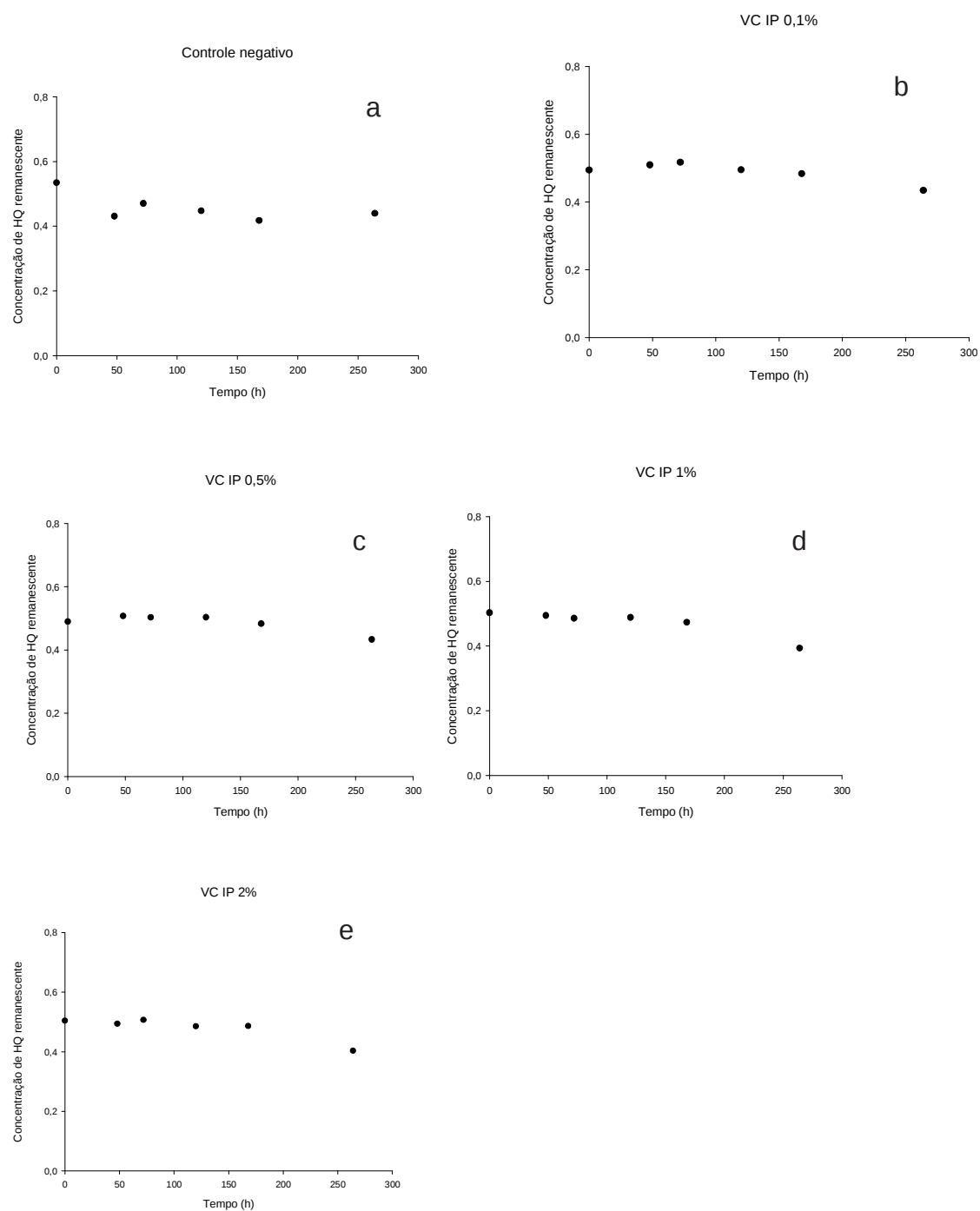


Figura 7: Comparação da degradação da HQ sem antioxidante e com VC IP em ensaio de estabilidade a 45°C.

A partir dos gráficos expostos nas Figuras 6 e 7, pode-se analisar que a concentração de HQ diminuiu conforme o tempo de exposição do creme à temperatura elevada. Contudo observou-se também que a concentração de HQ começou a aumentar significativamente após algum tempo de exposição. Na Figura 6 **a** que contém somente HQ sem sistema antioxidante, este aumento começou por volta de 72 h após a submissão do creme à estufa. Observou-se que a HQ com metabissulfito (b, c, d, e) apresentou uma queda inicial nas primeiras 48 h em todas as concentrações. Já na Figura 7, com o VC IP como antioxidante, ocorreu a queda de concentração de HQ após 96 h.

Todavia, como o gráfico apresentou um aumento de concentração de HQ nas horas seguintes, não pode-se afirmar que a quantificação do analito corresponda somente ao fármaco. Deduziu-se, que algum o produto de degradação produzido pelo estresse físico, decorrente da elevação de temperatura do estudo de estabilidade, talvez estivesse interferindo na quantificação da HQ, ocasionando sobreposição de bandas que é o que ocorre quando, mais de uma substância absorve luz no mesmo comprimento de onda.

Análise Visual da degradação da HQ

A análise visual da decomposição da HQ é um ensaio qualitativo que tem por finalidade avaliar a decomposição da HQ acompanhando o escurecimento das amostras, conforme Figura 8.



Figura 8: Fotografia da degradação de creme contendo HQ. Da esquerda para a direita encontram-se: HQ sem antioxidante, metabissulfito de sódio 0,1%, 0,5%, 1% e 2%, VC IP 0,1%, 0,5%, 1% e 2%. Fotografias tiradas nos tempos 0 h **(a)**, 72 h **(b)** e 264 h **(c)**.

Na análise visual da decomposição da HQ, pode-se observar qualitativamente que o VC IP não conseguiu estabilizar formulação da HQ, pois obteve o mesmo grau de escurecimento da amostra do controle negativo, ou seja, da HQ sem qualquer antioxidante. Talvez este fato possa ser explicado pela natureza lipofílica do VC IP. O VC IP é um éster derivado da vitamina C, e, portanto lipossolúvel. Tal propriedade confere ao VC IP maior afinidade pela fase oleosa do creme. Assim, a migração do antioxidante para a fase oleosa manteria os componentes da fase aquosa, vulneráveis a oxidação, favorecendo a degradação da HQ.

Estabilidade acelerada a 65°C

Como o VC IP não mostrou eficácia na avaliação visual, permitindo que a HQ oxide na mesma intensidade do creme sem antioxidante, a intenção de recolocá-lo neste experimento foi de tentar quantificar a porcentagem de HQ remanescente. O ácido α lipóico foi escolhido, pois possui ação mais hidrofílica que o VC IP, protegendo a HQ da ação oxidativa da água. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Concentrações de HQ ($\mu\text{g/mL}$) obtidas por espectrofotometria em UV – Vis

<i>Tempo (h)</i>	<i>HQ</i>	<i>ácido α lipóico</i>	<i>VC IP</i>
0	0,593	0,736	0,560
2	0,560	0,764	0,569
4	0,654	0,780	0,644
6	0,610	0,830	0,532
8	0,578	0,787	0,516
10	0,538	0,756	0,595
12	0,567	0,653	0,540

Com a finalidade de obter a porcentagem de decomposição em cada antioxidante utilizado, a média inicial e a média final da concentração de HQ ($\mu\text{g/mL}$) para cada sistema antioxidante foram analisadas. Para a HQ sem antioxidante a porcentagem de decomposição foi de 4,39%, para o creme com HQ contendo ácido α lipóico como sistema antioxidante, a porcentagem de decomposição da HQ foi de 11,27% e para o VC IP foi de 3,57%. A análise estatística destes resultados mostra que a amostra de HQ sem antioxidante e a amostra que contém ácido α lipóico como sistema antioxidante são significativamente diferentes (p valor = $9,095 \cdot 10^{-6}$) com nível de significância de 5%. Já a amostra que contém VC IP quando comparada com a amostra sem

antioxidante, no mesmo intervalo de confiança, não apresentou diferença estatisticamente significativa (p valor = 0,182). Quando as amostras dos dois antioxidantes, VC IP e ácido α lipóico foram comparadas, verificou-se que elas possuem diferença estatisticamente significativa, apresentando um p valor de $4,771 \cdot 10^{-6}$. A partir destes resultados, temos que a amostra de creme que possui VC IP como sistema antioxidante, possui o mesmo perfil estatístico de degradação que a amostra que contém somente a HQ sem antioxidante, como pode ser observado no gráfico de decomposição das Figuras de 9, 10 e 11.

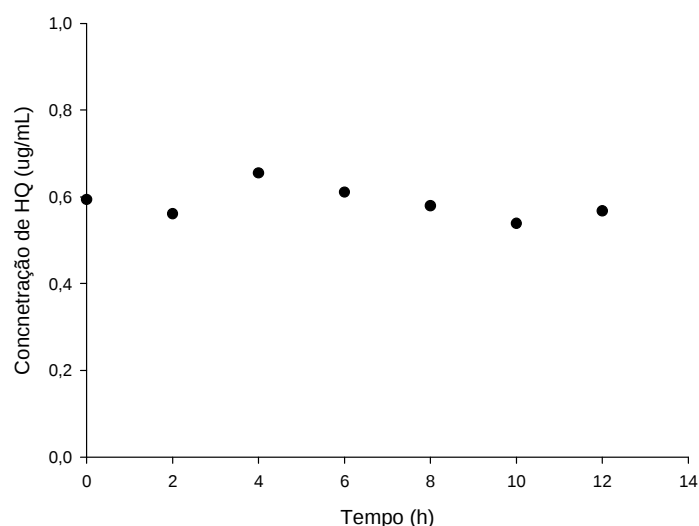


Figura 9: Decomposição da HQ a 65 °C.

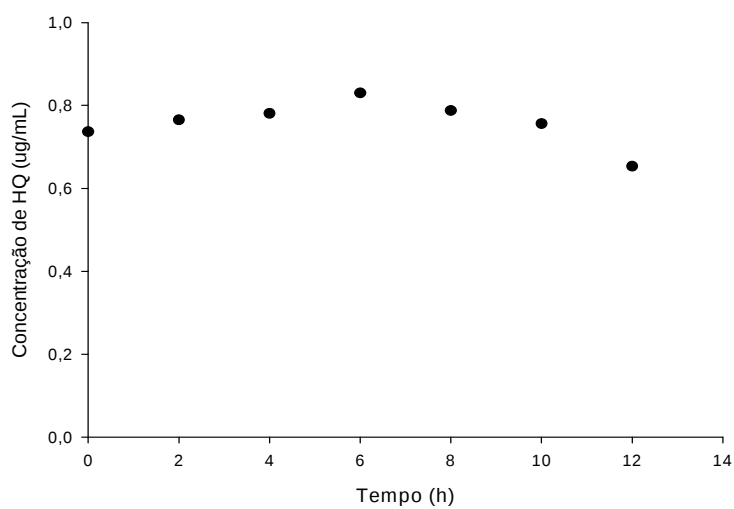


Figura 10: Decomposição da HQ contendo ácido alfa lipóico como sistema antioxidante a 65°C.

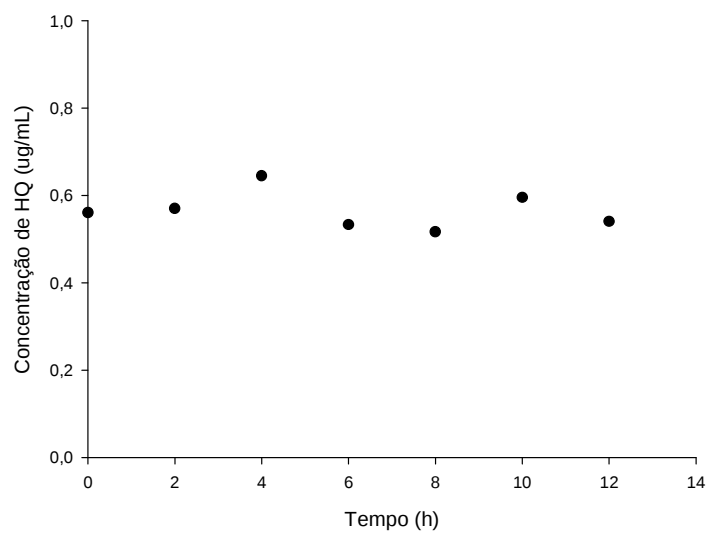


Figura 11: Decomposição da HQ contendo VC IP como sistema antioxidante a 65°C.

Os gráficos das figuras de 8 a 11 mostram também o perfil de decomposição da HQ na preparação sem antioxidante e quando os antioxidantes foram incorporados ao creme. Pode-se observar que o perfil da HQ sem antioxidante (Figura 12) é o mesmo da HQ com VC IP como sistema antioxidante (Figura 14). Mesmo apresentando menor porcentagem de decomposição que o ácido α lipóico, por apresentar o mesmo perfil que a HQ sem antioxidante, o VC IP não pode ser considerado um antioxidante adequado para este tipo de formulação. Ao comparar VC IP e ácido α lipóico, pode-se considerar que o segundo possui um melhor perfil que o primeiro, mesmo apresentando maior taxa de degradação de HQ em relação à concentração inicial e final do creme no ensaio de estabilidade.

2.3.1.2. Validação da metodologia

Linearidade

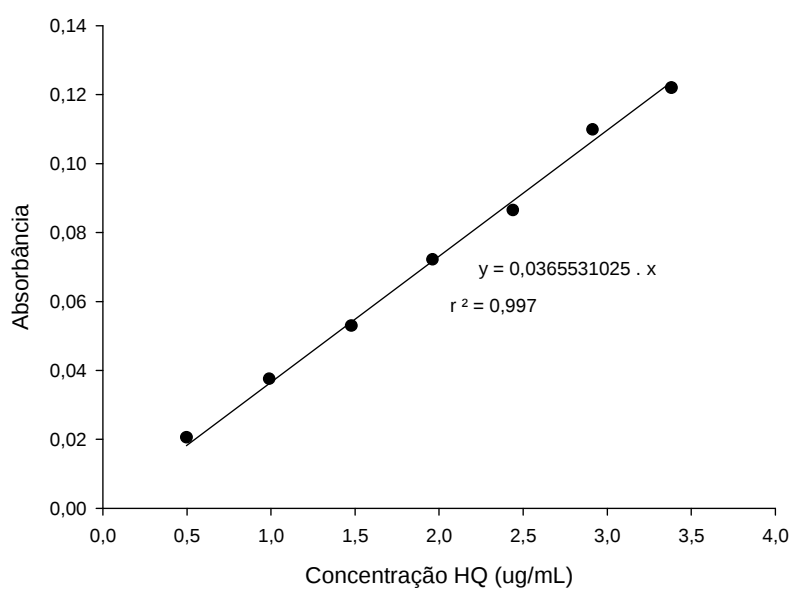
O valor do coeficiente de regressão linear (r^2) é o indicador de linearidade do método, o que implica que as concentrações analisadas correspondem proporcionalmente às absorbâncias encontradas, uma vez que o valor de 0,997 encontrado é muito próximo a 1 (Figura 12).

Na Tabela 8 encontram-se os volumes adicionados a 2,0 mL diretamente na cubeta, a respectiva concentração obtida e os valores de absorbância encontrados para cada ensaio, realizado em triplicata. A partir das médias, construiu-se a curva analítica, conforme Figura 12.

Tabela 8: Ensaio de linearidade.

Volume (μL)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância <i>n</i> 1	Absorbância <i>n</i> 2	Absorbância <i>n</i> 3	Absorbância <i>média</i>	DP
10	0,4975	0,0230	0,0201	0,0187	0,021	0,002
20	0,9900	0,0391	0,0386	0,0349	0,038	0,002
30	1,4778	0,0542	0,0526	0,0521	0,053	0,001
40	1,9607	0,0787	0,0698	0,0680	0,072	0,006
50	2,4390	0,0872	0,0873	0,0851	0,087	0,001
60	2,9126	0,1031	0,1256	0,1009	0,110	0,014
70	3,3816	0,1207	0,1268	0,1185	0,122	0,004

DP = desvio padrão

**Figura 12:** Curva analítica de HQ em álcool etílico.

Precisão

A precisão de uma metodologia analítica representa o grau de concordância entre os resultados das análises individuais, quando o procedimento for aplicado a uma amostra homogênea, nas mesmas condições de teste. Envolve a avaliação do grau de dispersão dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra, avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (BRITTAIN, 1998; BRASIL, 2004).

Segundo as normas estabelecidas pela ANVISA (BRASIL, 2003), a precisão pode ser avaliada por três parâmetros: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste trabalho foram avaliadas somente a repetibilidade e a precisão intermediária. A reprodutibilidade foi excluída pela dificuldade em realizar o experimento em outro laboratório, com outro analista.

Repetibilidade

Tabela 9: Valores de precisão obtidos no ensaio de repetibilidade para HQ.em creme.

<i>Concentração teórica HQ (µg/mL)</i>	<i>média</i>	<i>DP</i>	<i>CV%</i>
0,4975	0,386433	0,0084018	2,174193
1,9607	2,091333	0,067248	3,215557
3,3816	3,527433	0,107476	3,046862

DP = desvio padrão

CV (%) = coeficiente de variação

Conforme os resultados expostos na Tabela 9, o método analítico testado apresenta boa repetibilidade, uma vez que as normas específicas (BRASIL, 2003) consideram um método analítico preciso quando este possui coeficiente de variação inferior a 5%. O valor do coeficiente de variação obtidos para a menor concentração foi 2,174 para a concentração mediana foi 3,216 e para a maior

concentração analisada foi 3,045. Todos os valores de CV indicam boa repetibilidade e precisão da metodologia.

Precisão intermediária

A ANVISA (BRASIL, 2003) preconiza que a precisão intermediária dever ser realizada em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes.

O ensaio foi realizado por analistas diferentes, denominados analista A e analista B. Cada analista realizou o ensaio de precisão de três concentrações diferentes da curva analítica, uma concentração baixa de 0,4975 ug/mL , uma intermediária de 1,9607 ug/mL e uma alta de 3,3816 ug/mL em triplicata, em dois dias diferentes, denominados dia 1 e dia 2. Os resultados de cada concentração, obtidos por cada analista com suas respectivas médias e coeficiente de variação, encontram-se dispostos na Tabela 10.

Tabela 10: Valores médios (n=3) obtidos na análise de precisão intermediária.

<i>Analista</i>	<i>dia</i>	<i>Concentração teórica HQ (µg/mL)</i>	<i>média</i>	<i>CV (%)</i>
A	1	0,4975	0,386	2,176632
A	1	1,9607	2,091	3,216069
A	1	3,3816	3,527	3,047236
B	1	0,4975	0,450	1,867067
B	1	1,9607	2,063	3,259719
B	1	3,3816	3,338	3,219772
A	2	0,4975	0,467	1,799101
A	2	1,9607	2,066	3,254985
A	2	3,3816	3,456	3,109838
B	2	0,4975	0,400	2,10045
B	2	1,9607	2,071	3,247127
B	2	3,3816	3,494	3,076016

CV (%) = coeficiente de variação

Os resultados obtidos indicam que o método proposto mostra-se preciso também para o ensaio de precisão intermediária, pois em nenhuma das amostras analisadas obteve-se coeficiente de variação superior a 5%. A precisão intermediária é um teste importante, uma vez que é realizado por dois analistas diferentes em dias diferentes, o que propõe que não há interferências significativas na reprodução da metodologia.

Recuperação e exatidão

Tabela 11: Médias dos valores de HQ obtidas no ensaio de recuperação.

<i>Volume de SE adicionado</i>	<i>Concentração teórica (ug/mL)</i>	<i>Média das concentrações obtidas</i>	<i>% recuperada</i>
10	0,9900	1,0090	101,91
40	2,4390	2,5308	103,76
60	3,3816	3,4647	102,46

No teste de recuperação, as médias dos valores encontrados para cada concentração estão apresentadas na Tabela 11. Esses valores sugerem que a recuperação do método analítico é satisfatória, todas as concentrações analisadas se enquadram na variação de 94 a 106% preconizada pela USP 25 (2002).

Tabela 12: Médias das concentrações (n = 3) obtidas no ensaio de exatidão.

<i>Concentração teórica (ug/mL)</i>	<i>Média das concentrações obtidas</i>	<i>Exatidão</i>
0,4975	0,486433	97,77
1,9607	2,091333	106,66
3,3816	3,527433	104,31

Na tabela 12 encontram-se os dados do ensaio de exatidão. A exatidão é expressa pela equação 7.

Para uma metodologia ser considerada exata, a ANVISA (2002) permite que os resultados obtidos a partir da equação de exatidão tenham uma flutuação de 5% em relação a média teórica, ou seja, de 95 a 105%. Os resultados obtidos com essa metodologia são satisfatórios, pois as três concentrações analisadas estão de acordo com as normas.

Ácido sulfúrico 0,1N.

Para a realização desta metodologia, que utiliza ácido sulfúrico como solvente, considerou-se a formação do produto de degradação BQ, por isso a técnica utilizada será a espectrofotometria de derivadas. O gráfico apresentado na Figura 13 mostra a varredura da HQ e da BQ em primeira derivada, a fim de identificar o ponto de *zero crossing* que ocorreu em 225 nm e 230 nm. Esses dois comprimentos de onda foram considerados apropriados para a quantificação da HQ em presença de BQ, pois nestes pontos a derivada da absorbância da BQ é zero (*zero crossing*), permitindo que a HQ seja quantificada sem a interferência da sobreposição de bandas da BQ. A partir destas considerações, foi analisada a linearidade de cada ponto proposto, para padronizar o comprimento de onda que apresentou a melhor faixa de linearidade.

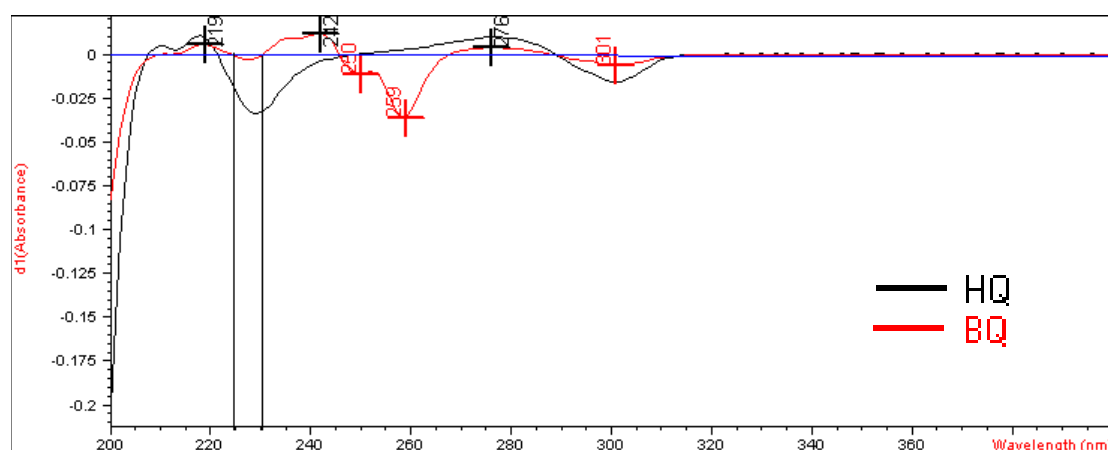


Figura 13: Espectro de varredura em derivada da HQ e BQ em ácido sulfúrico 0,1N.

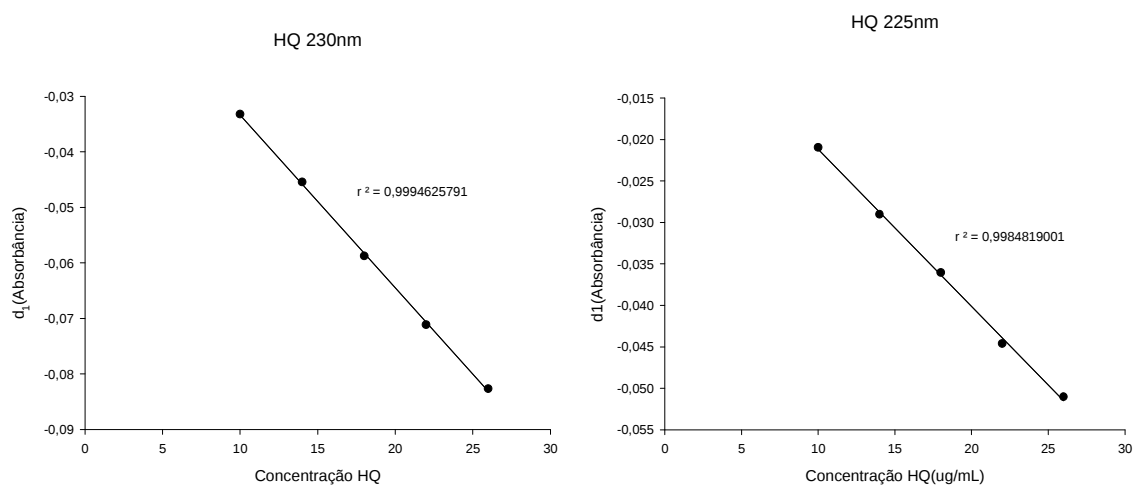


Figura 14: Linearidade da HQ obtida por espectrofotometria de derivada em 230 e 225 nm.

Na Figura 14 pode-se observar que apesar de a diferença de correlação linear ser mínima, o ponto que obteve melhor linearidade foi o de 230 nm. Portanto, as leituras foram realizadas neste comprimento de onda.

Estabilidade acelerada

A quantidade de HQ encontrada, em média, para cada concentração encontra-se na Tabela 13.

Tabela 13: Concentração de HQ remanescente após degradação acelerada a 65°C por 96 h.

Tempo (h)	Valor da d1 (230 nm)	Concentração de HQ Remanescente (µg/mL)
0	-0,0581	18,0240
1	-0,0558	17,3105
2	-0,0545	16,9072
3	-0,0592	18,3652
4	-0,0591	18,3342
5	-0,0616	19,1098
6	-0,0594	18,4273
24	-0,0568	17,6207
96	-0,0718	22,2740

Por meio da equação de reta obtida na curva analítica, a concentração de HQ foi calculada para os valores das médias obtidas em primeira derivadas durante 96 h. A quantidade de HQ remanescente decaiu nas 3 primeiras horas e começou a aumentar a partir da terceira hora, mantendo-se estável até a sexta hora. A leitura seguinte ocorreu no tempo de 24 h e a HQ apresentou queda na concentração. Porém, após 96 h, a concentração de HQ remanescente voltou a aumentar. Considerando que após sofrer estresse térmico e conseqüente degradação, a concentração de HQ remanescente deveria diminuir em relação à concentração inicial. O aumento da concentração de HQ encontrado indica que a técnica não se mostrou adequada ou o creme escolhido para a incorporação da HQ não seja compatível com o solvente utilizado, uma vez que esta metodologia foi desenvolvida e validada em outras condições experimentais (LOPEZ-GARCIA et al., 2005).

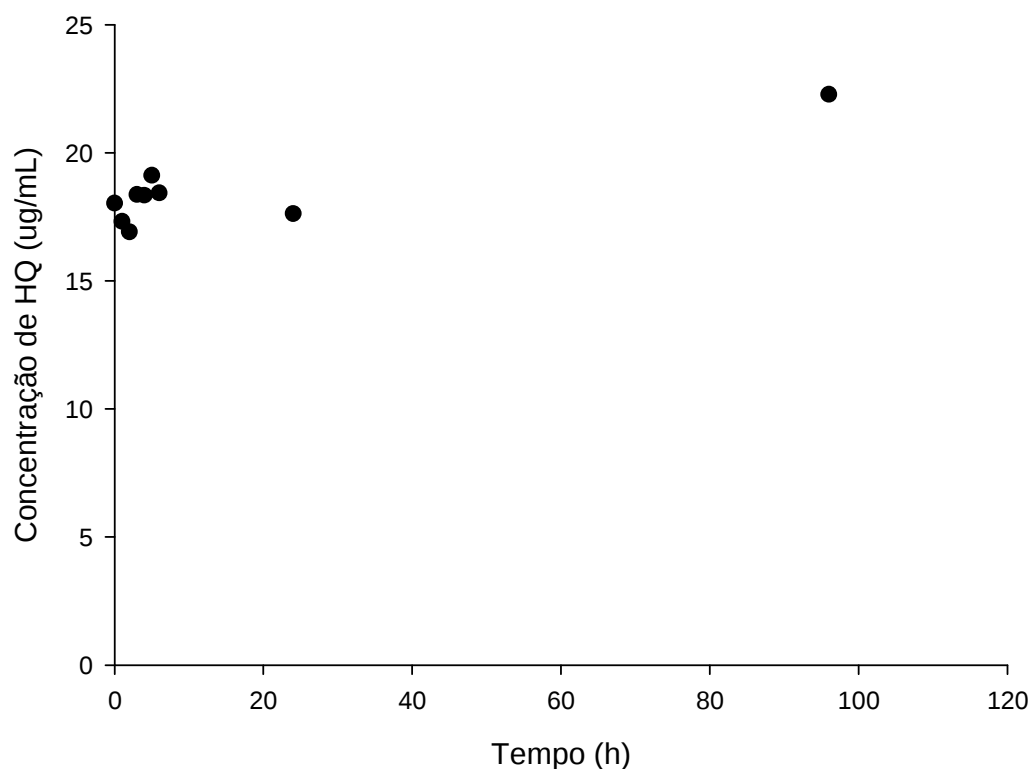


Figura 15: Concentração de HQ remanescente em função do tempo de permanência do creme na estufa a 65°C.

Na Figura 15 pode-se observar um aumento considerável na concentração de HQ no decorrer das horas, principalmente até 20 h após o início do experimento, apresentando concentração muito maior que a inicial de HQ no tempo de 96 h. Como os resultados eram obtidos por espectrofotometria de primeira derivada como pode-se observar na Figura 16b, a presença de um segundo pico representado pela linha preta do espectro sugere a possível presença de um segundo produto de degradação. Porém quando o espectro é convertido para absorbância, o espectro formado indica que a amostra analisada está com a linha base deslocada, o que interfere diretamente na quantificação da HQ, que pode ser explicado por uma falha na metodologia. Como o solvente utilizado é ácido sulfúrico 0,1N, a quantidade de água no solvente é bastante alta,

o que impossibilita a total solubilização do creme, que por ser uma emulsão e, portanto conter fase oleosa, não pode ser solubilizado somente pela água, que é um solvente hidrofílico. Assim sendo, a solução obtida para a realização das leituras era de cor esbranquiçada, o que faz que a luz emitida pelo espectrofotômetro difunda-se, e então o resultado do espectro foi alterado, pois houve um deslocamento da linha base, conforme ilustrado na Figura 16.

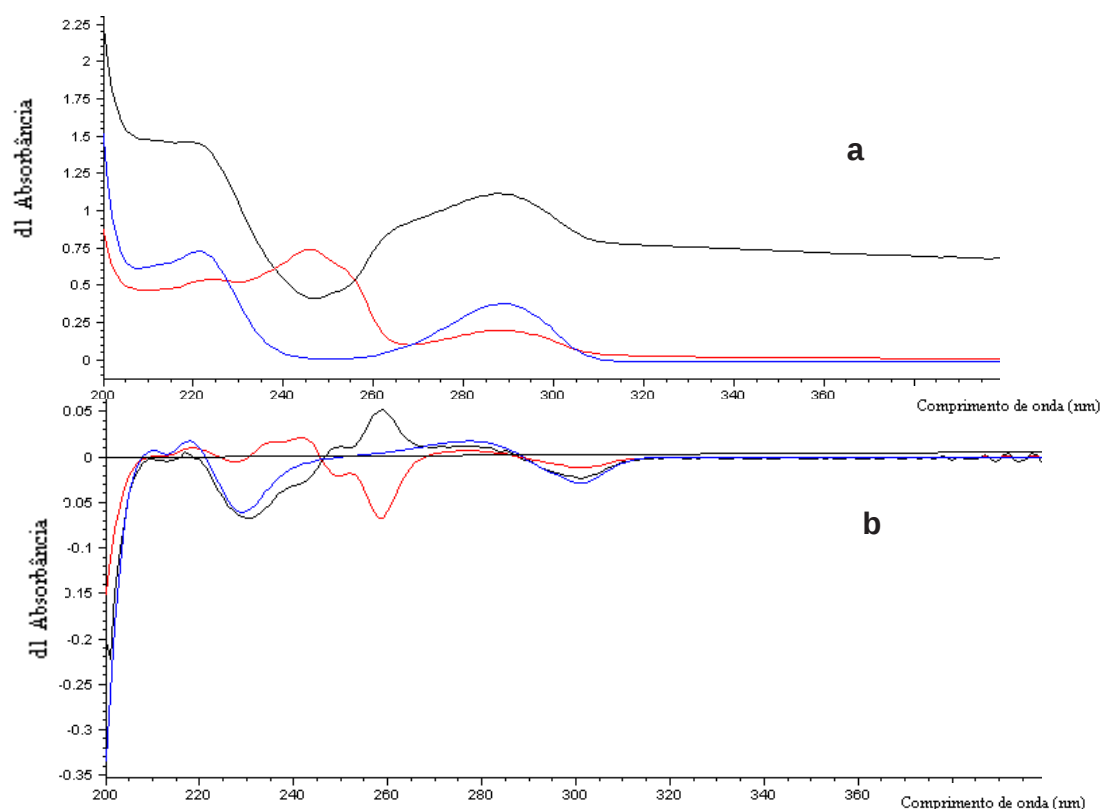


Figura 16: Caracterização do deslocamento da linha base.

a Espectro obtido em absorbância, **b** Espectro obtido em primeira derivada.

Validação da Metodologia

Linearidade

O coeficiente de regressão linear obtido na construção da curva analítica de HQ em ácido sulfúrico 0,1 N apresentou-se satisfatório, com valor de 0,999. A linearidade da curva (Figura 21) garante a quantificação do fármaco em qualquer faixa de concentração que esteja dentro da faixa de concentração analisada.

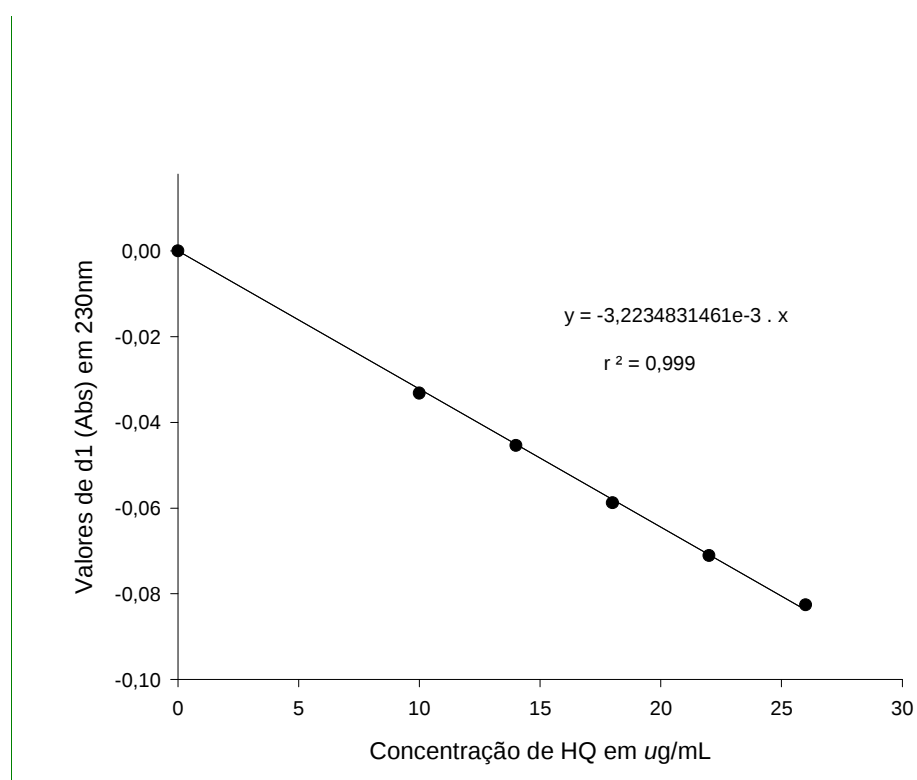


Figura 17: Curva analítica de HQ em ácido sulfúrico 0,1N.

Precisão:**Repetibilidade**

Na Tabela 15 encontram-se os resultados obtidos no ensaio de repetibilidade. As três concentrações foram obtidas a partir do creme contendo 2% de HQ. As análises foram realizadas em triplicata e a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação das amostras foram obtidos como parâmetro de comparação.

Tabela 14: Valores obtidos a partir de três concentrações diferentes no teste de precisão, com respectiva média, desvio padrão e coeficiente de variação.

<i>Concentração de HQ (µg/mL)</i>	<i>n 1</i>	<i>n 2</i>	<i>n 3</i>	<i>média</i>	<i>DP</i>	<i>CV%</i>
10	12,389	12,460	11,503	12,117	0,5332	4,40
18	17,723	19,786	19,395	18,968	1,0958	5,78
26	25,481	26,259	26,342	26,028	0,4751	1,83

DP = desvio padrão

CV (%) = coeficiente de variação

Conforme os dados expostos na tabela 15, o método analítico testado é não possui boa repetibilidade, pois o coeficiente de variação obtido para a amostra de concentração intermediária foi superior a 5%.

Precisão intermediária

A tabela 15 apresenta os valores obtidos no ensaio de precisão intermediária de cada concentração analisada por cada analista nos dois dias de ensaio.

Tabela 15: Valores obtidos para precisão intermediária a partir de três concentrações diferentes por dois analistas em dias diferentes.

<i>analista</i>	<i>dia</i>	<i>concentração ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>média</i>	<i>desvio padrão</i>	<i>CV%</i>
A	1	10	12,117	0,53	4,40
A	1	18	18,968	1,10	5,78
A	1	26	26,028	0,48	1,83
B	1	10	12,013	0,53	4,44
B	1	18	17,441	1,10	6,28
B	1	26	25,727	0,48	1,85
A	2	10	8,715	0,53	6,12
A	2	18	16,874	1,10	6,49
A	2	26	24,314	0,48	1,95
B	2	10	9,414	0,53	5,66
B	2	18	17,016	1,10	6,44
B	2	26	25,524	0,48	1,86

CV (%) = coeficiente de variação

Conforme pode ser observado nos resultados que se encontram na Tabela 16, algumas amostras analisadas não apresentaram boa precisão intermediária, pois o coeficiente de variação obtido para cada amostra de cada concentração não pode ultrapassar a 5%, conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003). Valores do coeficiente de variação não foram satisfatórios nos casos em que o desvio padrão é alto em relação à média (analista A: 10 $\mu\text{g/mL}$ no dia 2, 18 $\mu\text{g/mL}$, nos dias 1 e 2; analista B: 10 $\mu\text{g/mL}$ nos dias 1 e 2, 18 $\mu\text{g/mL}$, nos dias 1 e 2),

Exatidão e recuperação

A Tabela 16 apresenta os valores de concentração encontrados e a porcentagem recuperada em cada concentração.

Tabela 16: Média dos valores de HQ em $\mu\text{g/mL}$ obtidos no ensaio de recuperação.

<i>Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Concentração encontrada</i>	<i>Quantidade recuperada (%)</i>
13	12,79	$98,38 \pm 0,07$
17	16,525	$97,21 \pm 0,21$
22	21,77	$98,95 \pm 0,36$

A USP 25 (2002) preconiza que o ensaio de recuperação deve obter resultados que variem entre 94 e 106%. A Tabela 16 apresenta os resultados de recuperação. Todas as concentrações teóricas propostas foram analisadas e apresentaram porcentagem de recuperação que flutuam entre 98,95% para concentração de 22 $\mu\text{g/mL}$ e 98,38% para a concentração de 13 $\mu\text{g/mL}$. Conforme o que foi exposto, os resultados do ensaio de recuperação são considerados satisfatórios.

A Figura 18 ilustra as proporções obtidas por espectrofotometria de derivadas na região do UV-Vis no comprimento de onda de 230 nm.

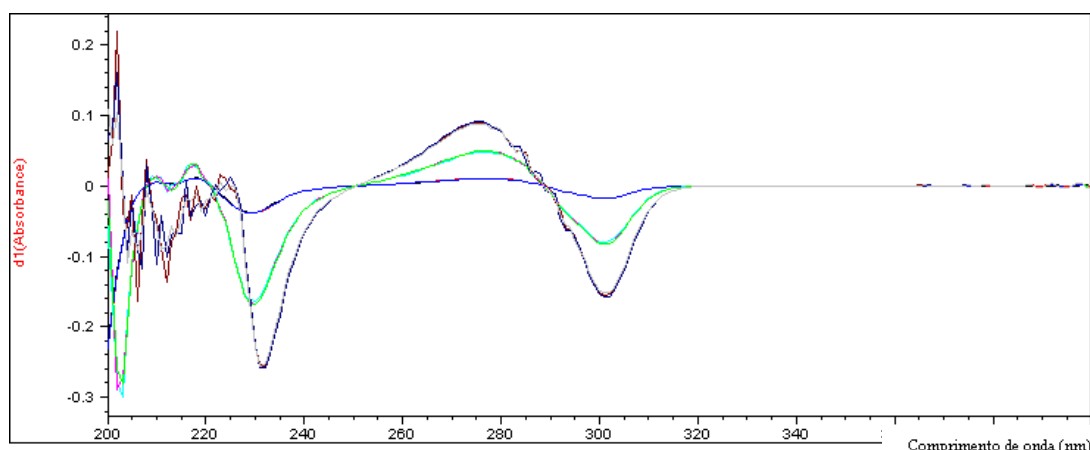


Figura 18: Espectros obtidos no ensaio de recuperação de HQ utilizando ácido sulfúrico 0,1N como solvente.

Para a obtenção da exatidão do método proposto, pode-se analisar os resultados encontrados no ensaio de recuperação. Um método é considerado exato quando o valor obtido experimentalmente para cada concentração não ultrapassa 5% do valor teórico (BRASIL, 2002). A Tabela 17 apresenta os dados do ensaio de precisão avaliados para a exatidão.

Tabela 17: Valores das obtidos a partir de três concentrações diferentes.

<i>Concentração de HQ ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Média experimental ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Exatidão (%)</i>
10	12,79	127,90
18	16,53	91,83
26	21,77	83,73

O valor de exatidão encontrado para cada concentração analisada não foi satisfatório, uma vez que para 10 $\mu\text{g/mL}$ o valor de exatidão foi superior ao valor teórico em 27,9%; na concentração de 18 $\mu\text{g/mL}$, o valor de exatidão obtido foi inferior ao valor teórico em 8,2%, e finalmente, na concentração de 26 $\mu\text{g/mL}$, o valor de exatidão também foi inferior ao valor teórico, em 6,3%. Nenhum dos valores obtidos neste ensaio estão de acordo com a literatura oficial que prevê a

exatidão do método quando o resultado experimental obtido não ultrapassa 5% do valor teórico (BRASIL, 2002).

Pesquisa de interferentes

O objetivo da pesquisa de interferentes é garantir que o espectro obtido na análise do creme base não interfira na quantificação do fármaco. Observou-se que a linha vermelha correspondente ao placebo em cada uma das figuras (Figuras 19 a 21) está muito próxima ao zero no ponto de *zero crossing* ideal para a quantificação da HQ ($\lambda = 230$ nm). Essa anulação do placebo indica que não há interferência, ou que a interferência do placebo na quantificação da HQ é mínima.

Nas Figuras 19 a 21 encontram-se os gráficos de sobreposição dos cremes com os antioxidantes e da solução de HQ, sendo que a linha vermelha corresponde ao espectro do creme com o respectivo antioxidante e a curva em preto corresponde a solução de HQ a 18 $\mu\text{g/mL}$.

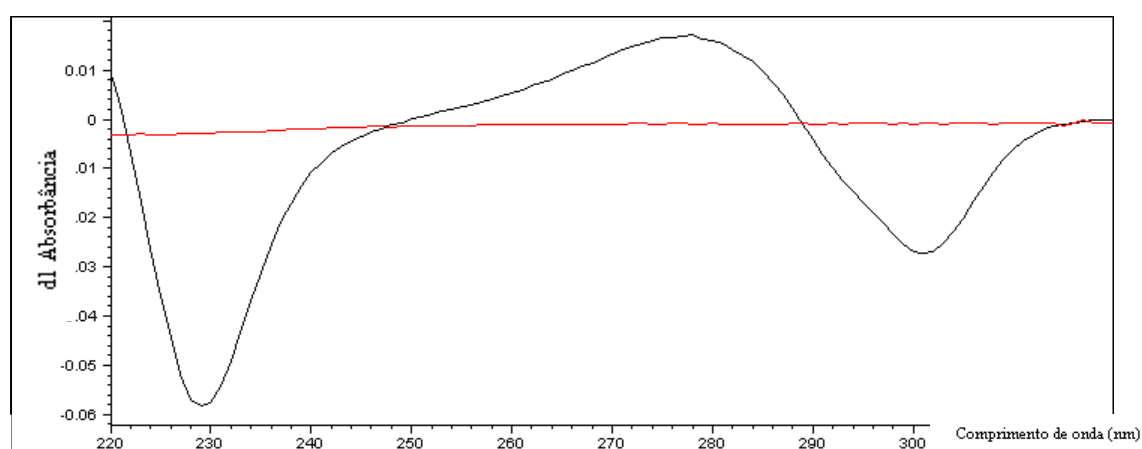


Figura 19: Sobreposição de espectros do creme contendo ácido α lipóico (linha vermelha) e HQ em solução ácido sulfúrico 0,1N a 18 $\mu\text{g/mL}$ (linha preta).

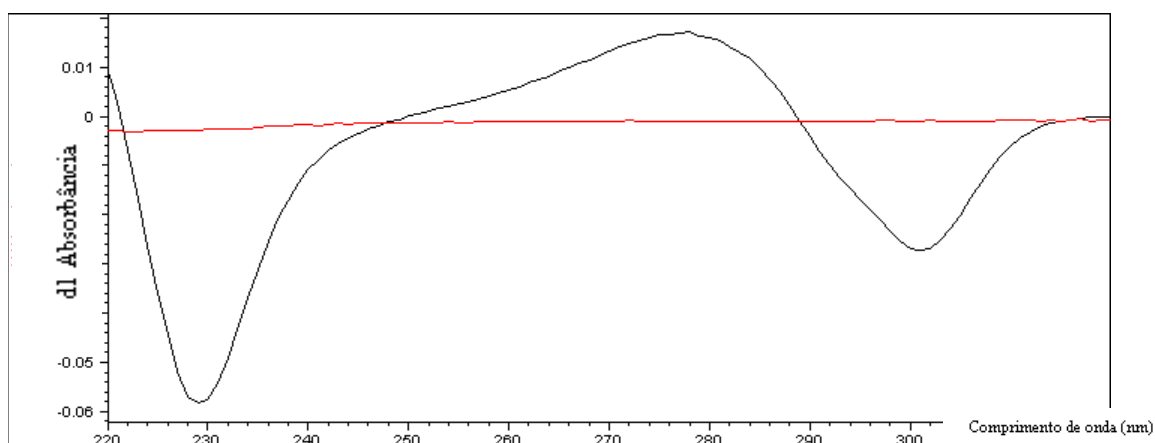


Figura 20: Sobreposição de espectros do creme contendo ditonito de sódio (linha vermelha) e HQ em solução ácido sulfúrico 0,1N a 18 µg/mL (linha preta).

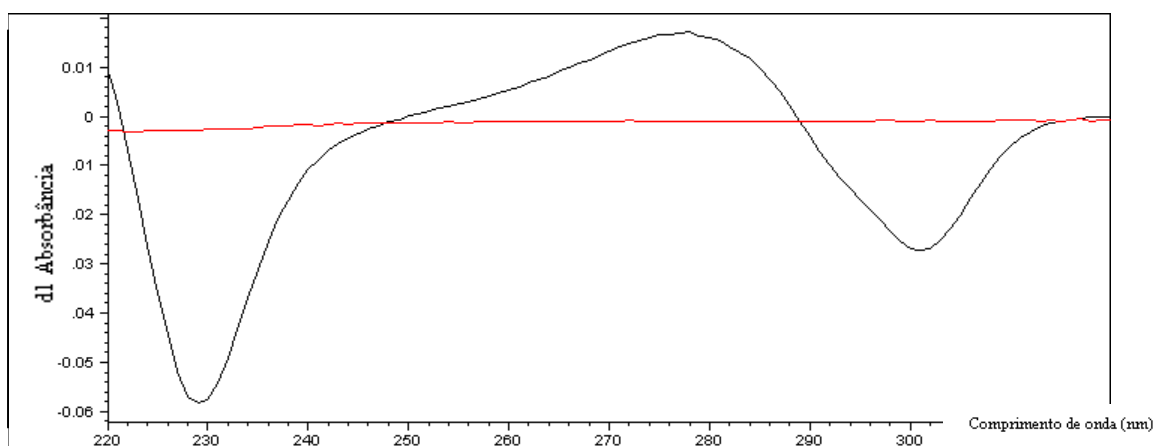


Figura 21: Sobreposição de espectros do creme contendo metabissulfito (linha vermelha) e HQ em solução ácido sulfúrico 0,1N a 18 µg/mL (linha preta).

Os gráficos apresentados mostram que não houve interferência do creme base na quantificação de HQ por espectrofotometria de derivadas na região do UV-Vis, pois a linha vermelha correspondente ao creme encontra-se próxima ao zero, enquanto a HQ, representada pelo espectro em preto possui um pico na faixa de leitura de 230 nm, indicando que não há interferência do creme e dos antioxidantes na leitura da HQ, e portanto, o método é específico.

4.3.3. Metanol

Esta metodologia foi desenvolvida a partir de dados coletados nas metodologias avaliadas anteriormente. O solvente escolhido foi o metanol, pois ele é capaz de solubilizar completamente o creme e com isso não interferir no espalhamento de luz do espectrofotômetro, não deslocando a linha de base e impedindo que haja quantificação errônea do fármaco.

A metodologia descrita da farmacopéia (USP 25, 2002) foi adaptada para reduzir o gasto de metanol, com a utilização de uma escala dez vezes menor da proposta na farmacopéia.

Como a metodologia da farmacopéia aplica-se somente para cremes recém manipulados, no qual considera-se que não haja formação de produto de degradação, adaptamos o uso de espectrofotometria de derivadas para poder quantificar a HQ na presença de BQ.

Na USP 25 (2002) está descrito um ensaio para quantificação de HQ em creme. O inconveniente deste processo, é que ignora-se a presença do produto de degradação o que torna esta metodologia inviável para o teste de estabilidade.

Sendo assim, utilizou-se o solvente sugerido pela farmacopéia (metanol), capaz de solubilizar completamente tanto a fase oleosa quanto a fase aquosa do creme. A completa solubilização do creme garante que a linha base seja mantida e que não haja desvios que comprometam a quantificação da HQ.

Observa-se na Figura 22 que no ponto de *zero crossing*, o valor da derivada da absorbância da BQ é próximo ao zero e o valor da derivada da absorbância da HQ, diferente de zero. Deste modo, mesmo em presença de seu produto de degradação, a HQ pode ser identificada e quantificada sem qualquer interferência resultante da aceleração da reação de oxidação pela temperatura.

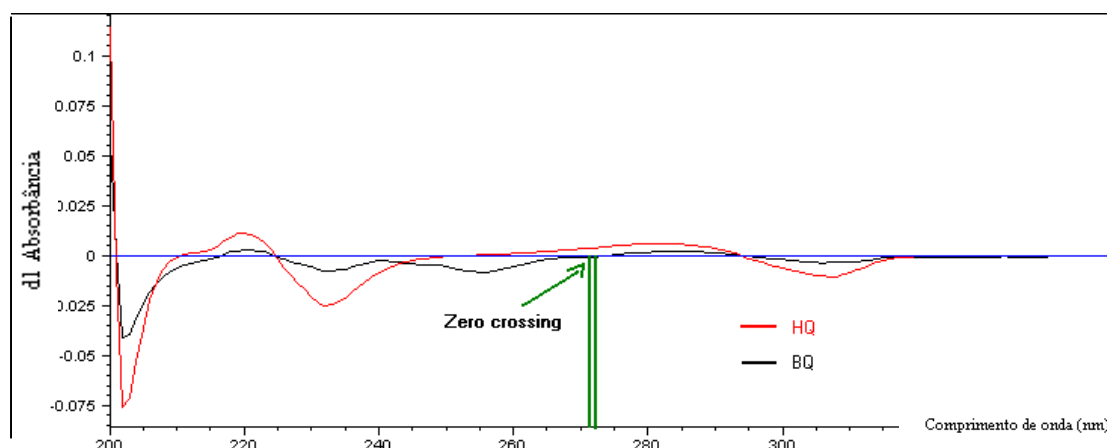


Figura 22: Caracterização e identificação do ponto de *zero crossing* da HQ em metanol. Solução de HQ a 18 $\mu\text{g/mL}$ (linha vermelha), BQ a 18 $\mu\text{g/mL}$ (linha preta)

A Figura 22 mostra os espectros de derivada de absorvância para a caracterização do ponto de *zero crossing*. A linha vermelha corresponde a solução de HQ de concentração 18 $\mu\text{g/mL}$, a linha preta corresponde a solução de BQ obtida na mesma concentração da HQ e a linha azul é somente um ponto ilustrativo para a localização de absorvância zero pelo espectro. O ponto de *zero crossing* utilizado para a realização das leituras é de 271 nm.

4.3.3.1. Validação da metodologia

Linearidade

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de regressão linear da curva analítica da hidroquinona em metanol apresentada na Figura 23.

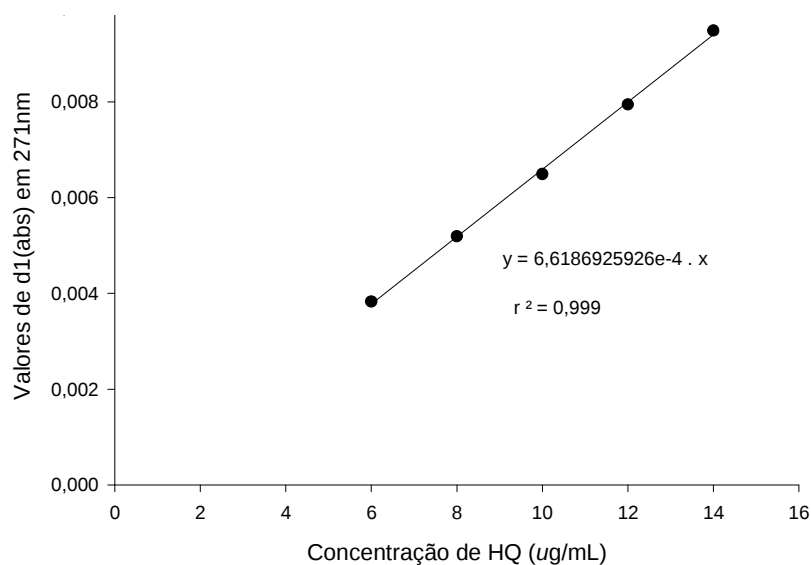


Figura 23: Curva analítica de HQ em metanol

O coeficiente de regressão linear obtido na curva analítica apresentada na Figura 23 foi de 0,999 garantindo a linearidade do método.

Precisão

A precisão de um método analítico representa a dispersão de resultados entre os ensaios realizados, com condições bem definidas e padronizadas.

Repetibilidade

Tabela 18: Valores de precisão obtidos a partir de três concentrações diferentes de creme contendo HQ.

<i>Concentração de HQ (µg/mL)</i>	<i>n 1</i>	<i>n 2</i>	<i>n 3</i>	<i>média</i>	<i>DP</i>	<i>CV%</i>
10	8,899	8,899	9,050	8,934	0,087	0,976
18	19,173	19,173	18,410	18,858	0,441	2,336
26	24,220	24,623	26,004	24,949	0,935	3,750

DP = desvio padrão

CV (%) = coeficiente de variação

Conforme os resultados apresentados na tabela 18, o método analítico testado mostra-se preciso, pois para todas as concentrações analisadas o CV foi inferior a 5%, estando dentro dos limites especificados pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Precisão intermediária

A ANVISA (BRASIL, 2003) preconiza que a precisão intermediária dever ser realizada em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes.

A Tabela 19 apresenta os valores obtidos no ensaio de precisão intermediária.

Tabela 19: Valores obtidos a partir de três concentrações diferentes de HQ em creme por dois analistas em dias diferentes.

<i>Analista</i>	<i>dia</i>	<i>Concentração</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>média</i>	<i>desvio</i> <i>padrão</i>	<i>CV%</i>
A	1	10	8,94	0,0951	1,06
A	1	18	18,86	0,4405	2,34
A	1	26	25,28	0,6050	2,39
B	1	10	9,70	0,0436	0,45
B	1	18	18,62	0,0828	0,45
B	1	26	26,38	0,0262	0,10
A	2	10	9,64	0,0271	0,28
A	2	18	18,30	0,0061	0,03
A	2	26	26,33	0,0052	0,02
B	2	10	10,75	0,1413	1,31
B	2	18	17,92	0,0044	0,02
B	2	26	27,61	0,0017	0,006

CV (%) = coeficiente de variação

Esses dados indicam que o método proposto possui precisão intermediária satisfatória, uma vez que não houve variação superior a 5% nos valores obtidos para o coeficiente de variação.

Exatidão

A exatidão foi calculada através da análise da concordância dos valores experimentais com o valor teórico. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Valores de exatidão obtidos a partir do teste de recuperação.

<i>Concentração teórica (Ct) µg/mL</i>	<i>Concentração encontrada (Ce) µg/mL</i>	<i>Exatidão (Ct/Ce)</i>
13	12,916	99,3846
17	17,815	104,7941
22	22,250	101,1364

Os valores de exatidão encontrados para cada concentração analisada mostraram que a metodologia desenvolvida é considerada exata, pois a razão entre a concentração teórica e a concentração experimental encontrada é inferior a 5%. As concentrações escolhidas para a realização do ensaio foram determinadas considerando que é necessário uma concentração baixa, uma média e uma alta da curva analítica, contemplando toda a faixa de linearidade da curva.

Recuperação

A Tabela 21 apresenta a média dos valores de concentração encontrados e a porcentagem recuperada para cada concentração.

Tabela 21: Valores de concentração de HQ em µg/mL obtidos no ensaio de recuperação.

<i>Concentração teórica (µg/mL)</i>	<i>Concentração encontrada (µg/mL)</i>	<i>Quantidade recuperada (% ± desvio padrão)</i>
13	12,91	99,32 ± 0,043
17	17,15	100,87 ± 0,017
22	22,53	102,39 ± 0,076

A USP 25 (2002) preconiza que cremes contendo HQ não devem ter menos que 94% e mais que 106% de HQ. De acordo com esta preconização, o ensaio de recuperação apresentou-se satisfatório em todas as concentrações analisadas.

4.3.3.2. Estabilidade acelerada

Os ensaios de estabilidade acelerada foram realizados em duas temperaturas diferentes, 55 °C e 45°C

Na Figura 24 encontra-se a concentração de HQ remanescente durante o tempo de armazenamento na estufa à 55°C

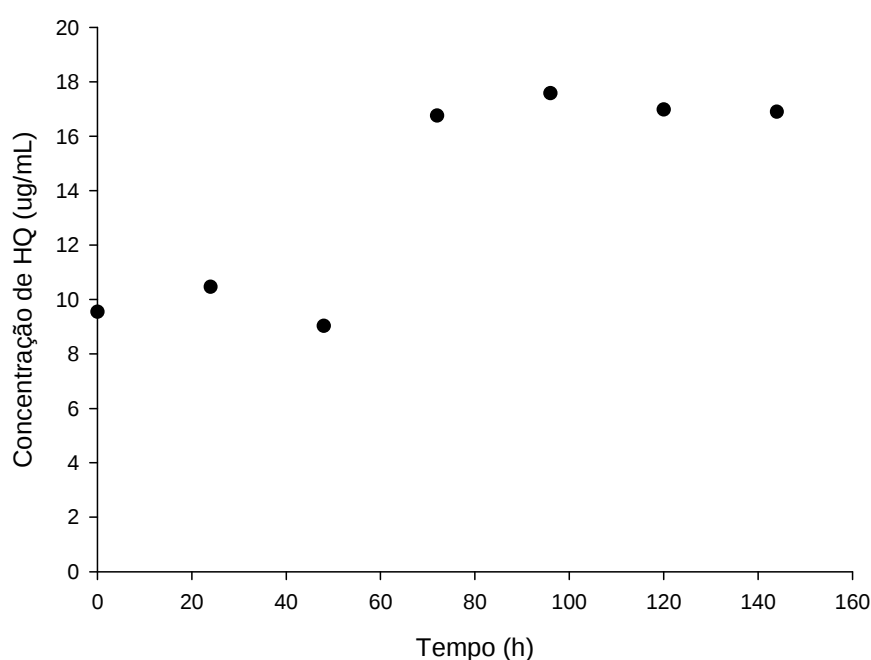


Figura 24: HQ remanescente em creme sem antioxidante (T = 55°C).

Para a avaliação da estabilidade acelerada da HQ a 55 °C, observou-se na Figura 28, que a concentração inicial de HQ foi cerca de 9 ug/mL. Em 48 h do início do experimento notou-se que houve uma queda na concentração de HQ para aproximadamente 8,5 ug/mL, supondo que haja uma possível decomposição da HQ e formação de seu produto de degradação.

A partir deste tempo, a concentração de HQ começou a subir novamente. Como o ponto de *zero crossing* obtido anulava somente a BQ, especulou-se que com o aumento da temperatura a reação de oxidação acelerou, causando uma decomposição rápida da BQ em outros produtos de degradação.

De acordo com a Figura 25, muitas rotas para a decomposição da HQ podem ser admitidas, e, portanto, seria necessário identificar os produtos de degradação presentes e adquirir os respectivos padrões, a fim de derivar a absorbância para cada um deles, para encontrar um ponto de *zero crossing* comum. Outra forma seria utilizar métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência, na qual as áreas sobre os picos obtidos poderiam ajudar a separar os componentes e assim quantificar a HQ baseado somente em seu pico característico.

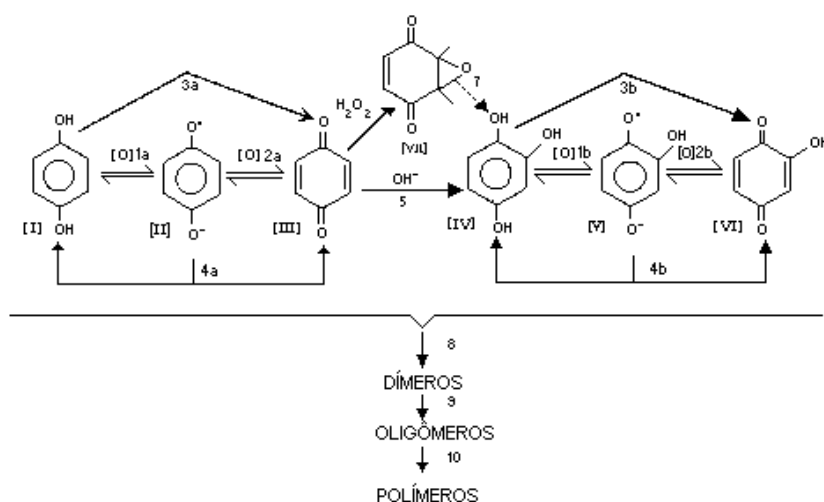


Figura 25: Ilustração esquemática da oxidação da HQ em meio básico.

I – *p*-benzohidroquinona (HQ); II – *p*-benzosemiquinona; III – *p*-benzoquinona(BQ); IV – 2-hidroxi-*p*-benzohidroquinona; V - 2-hidroxi-*p*-benzosemihidroquinona; VI - 2-hidroxi-*p*-benzoquinona; VII – 2,3-epoxi-*p*-benzoquinona. Adaptado de INCHEM.

A figura 26 apresenta o gráfico obtido da HQ remanescente em função do tempo em creme contendo metabissulfito de sódio como antioxidante. Como exposto anteriormente, a temperatura pode ter interferido na velocidade da reação de oxidação da HQ, levando a outro produto de degradação que não seja a BQ. A formação de um produto de degradação de espectro interferente poderia aumentar ou diminuir a amplitude do espectro referente à HQ, o que causaria a impressão de aumento ou diminuição da concentração de HQ remanescente.

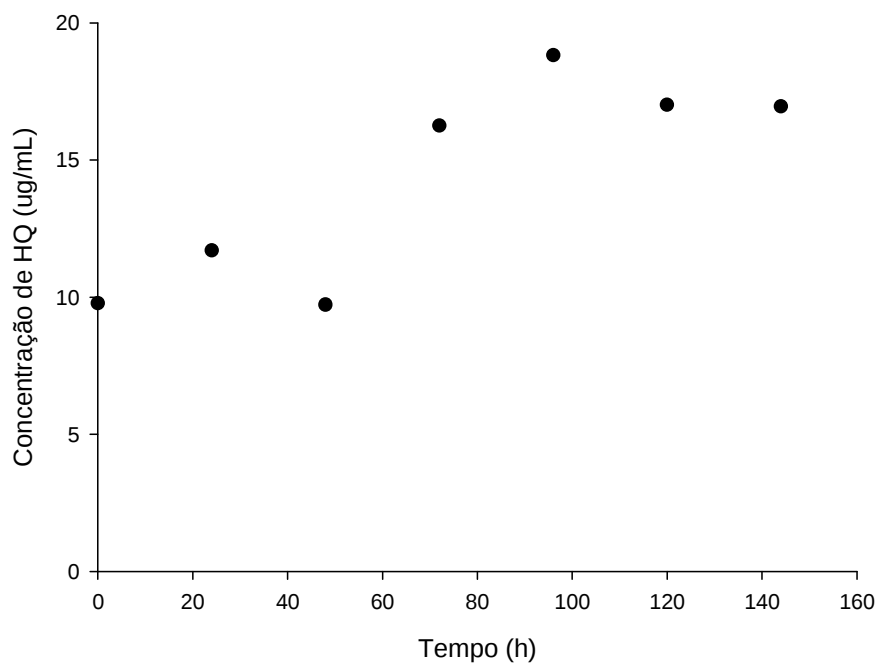


Figura 26: HQ remanescente em creme com metabissulfito de sódio ($T = 55^{\circ}\text{C}$).

Para poder analisar o perfil de degradação da HQ em cada sistema antioxidante proposto, foram construídos gráficos que correlacionam o logaritmo natural ($\ln$) da concentração de HQ (ug/mL) em função do tempo, dado em horas, conforme apresentado nas Figuras 27, 28 e 29.

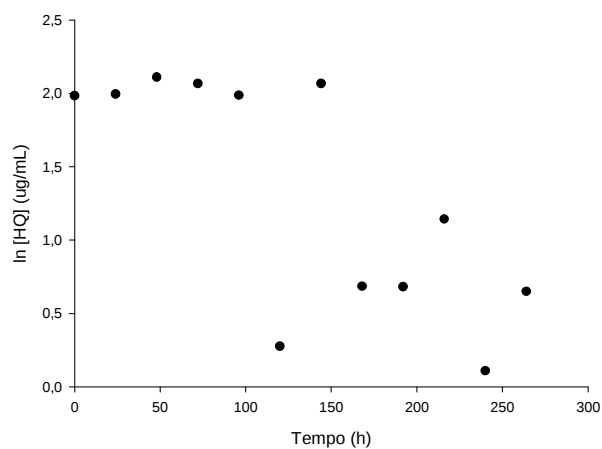


Figura 27: Perfil de degradação da HQ sem antioxidante

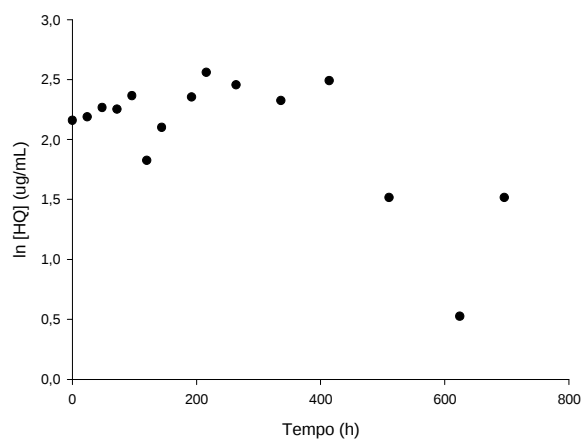


Figura 28: Perfil de degradação da HQ com ácido α lipóico

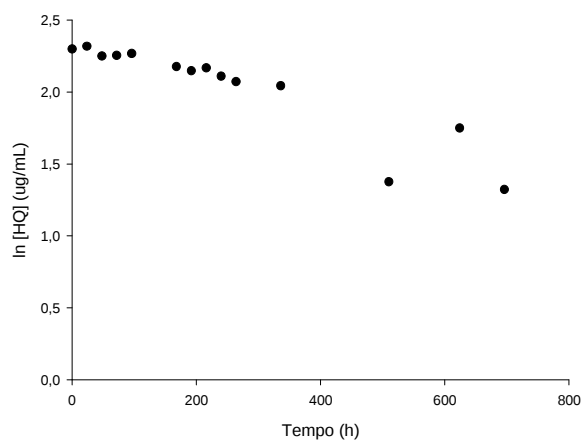


Figura 29: Perfil de degradação da HQ com metabissulfito de sódio

Com a finalidade de comparar estatisticamente os resultados obtidos, utilizou-se o teste t de variância. A amostra de HQ sem antioxidante (Figura 31) e a amostra que contém ácido α lipóico (Figura 28) como sistema antioxidante são significativamente diferentes (p valor = 0,004591) com nível de significância de 5%. A amostra que contém metabissulfito de sódio (Figura 29) quando comparada com a amostra sem antioxidante (Figura 31), no mesmo intervalo de confiança, também apresentou diferença estatisticamente significativa (p valor = 0,01162). Quando as amostras dos dois antioxidantes (Figuras 28 e 29) foram comparadas entre si, o p valor obtido de 0,466437 mostra que não há diferença estatisticamente significativa.

Esses resultados, porém, indicam somente a diferença ou a semelhança estatística entre as amostras analisadas. Para poder definir qual dos sistemas foi mais eficiente, fez-se a porcentagem de degradação da HQ durante o tempo analisado. A HQ sem antioxidante apresentou 32,76% de degradação em relação à concentração inicial. A amostra que contém HQ e metabissulfito de sódio como sistema antioxidante apresentou uma decomposição de 24,28%, e a amostra que contém ácido α lipóico como antioxidante apresentou a taxa de degradação de 57,48%. Comparando os resultados estatísticos com os resultados de percentual de degradação, pode-se afirmar que o antioxidante que melhor estabilizou a HQ, mantendo-a estável, com a menor taxa de degradação foi o metabissulfito de sódio.

O ácido α lipóico quando comparado à amostra com HQ sem antioxidante, pareceu acelerar o processo de degradação, pois apresentou maior perda de HQ que a amostra sem antioxidante durante o tempo do ensaio de estabilidade acelerada. Contudo, deve-se considerar que o creme perdeu sua estabilidade, tornando-se fluido. Segundo dados fornecidos no laudo de fabricante, o ponto de fusão do ácido α lipóico é em torno de 59°C. A desestabilização do antioxidante levou a uma desestabilização do creme observada pela separação de fases. A água presente no creme, ao perder a emulsificação com a fase oleosa pode ter acelerado a oxidação da HQ.

Avaliação visual da decomposição da HQ a 55°C

A Figura 30 apresenta as fotografias tiradas em diversos tempos com a finalidade de avaliar a decomposição da HQ observando-se o escurecimento das amostras.

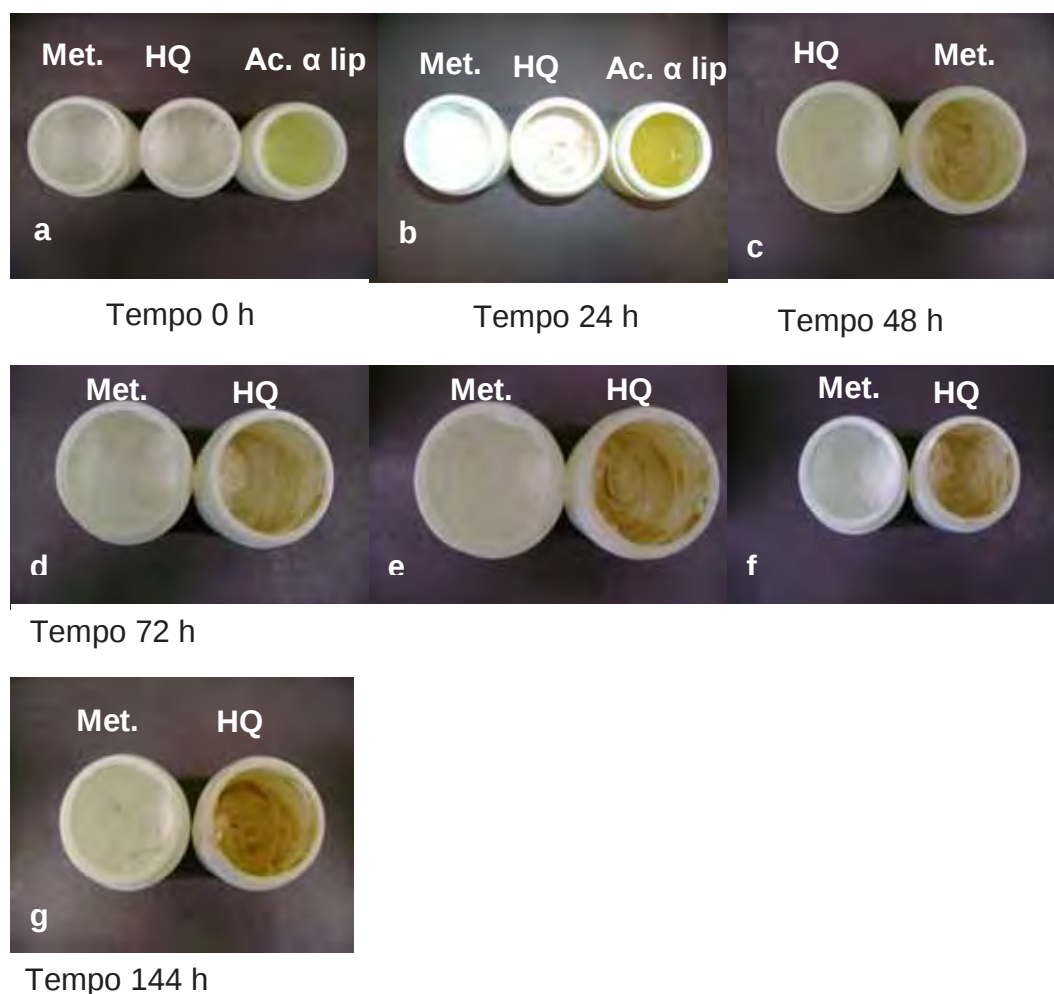


Figura 30: Fotografias da degradação da HQ por estresse térmico a 55°C. Análise realizada com base no escurecimento das amostras.

Na fotografia 30a, pode-se observar que as amostras contendo somente HQ e HQ com metabissulfito de sódio são brancas, enquanto a amostra contendo ácido α lipóico é amarelo claro. Na fotografia 30b, observou-se que a amostra

contendo metabissulfito continuou branca, a amostra contendo HQ começa a escurecer para um tom mais amarronzado. A amostra contendo ácido α lipóico desestabilizou, tornando-se líquido, possivelmente porque o ponto de fusão do ácido α lipóico, segundo dados do fabricante, é de aproximadamente 59°C. Sendo assim, esta amostra foi descartada. A partir da figura 30c observou-se um escurecimento gradual da amostra contendo somente HQ sem antioxidante, e a amostra contendo metabissulfito continuou mantendo sua coloração inicial. Essas observações indicam que a oxidação avaliada por meio visual foi apresentada somente na amostra que não contém o antioxidante. Como os resultados do estudo da estabilidade sofreram interferência de possíveis produtos de degradação, uma vez que foi verificado um aumento na concentração de HQ no decorrer do tempo, mesmo com a linha base alinhada, não foi possível quantificar a decomposição de HQ nos cremes, o que não permitiu afirmar que a oxidação ocorreu somente no creme sem antioxidante.

4.3.3.1.2. Estabilidade acelerada da HQ a 45°C

Na avaliação da estabilidade da HQ sem qualquer tipo de sistema antioxidante, pode-se observar na Figura 31 que a concentração de HQ remanescente caiu bruscamente após 72 h de exposição e manteve-se praticamente constante até 196 h. Após a última leitura, realizada após 264 h do início do experimento, observou-se que a concentração de HQ foi praticamente zero.

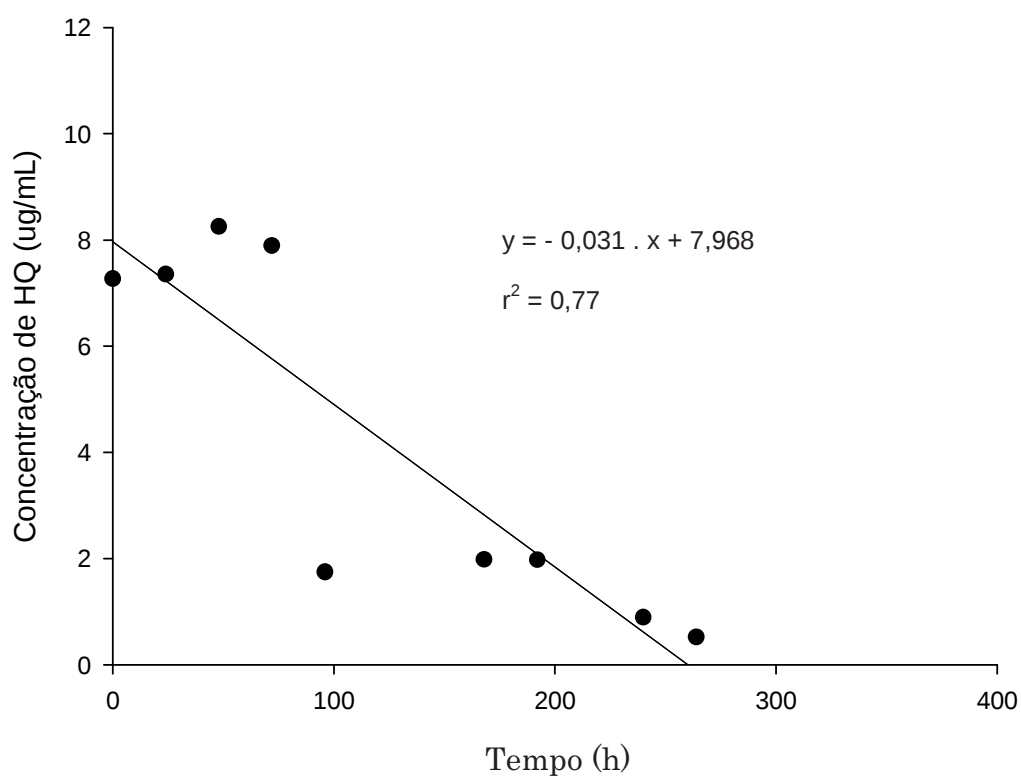


Figura 31: Decomposição da HQ a 45°C sem antioxidante.

Com base no que foi exposto e considerando que o produto perde o prazo de validade quando a concentração inicial decai 10%, de acordo com a equação 1 o produto expirou o prazo de validade a 45°C em menos de 24 horas.

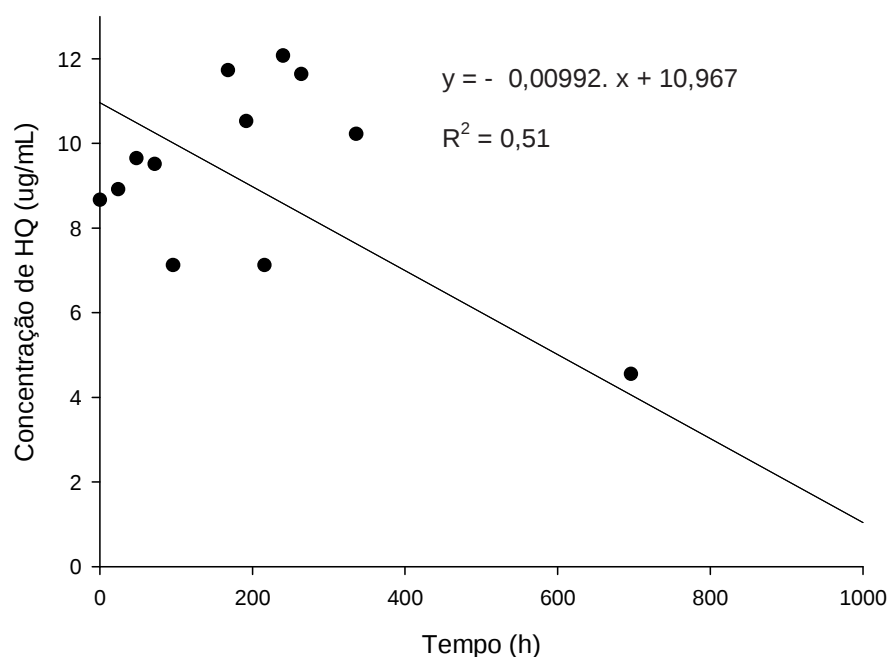


Figura 32: Decomposição da HQ contendo metabissulfito como sistema antioxidante a 45°C.

Na avaliação da estabilidade de HQ com sistema antioxidante composto por metabissulfito de sódio, a decomposição da HQ submetida a estresse térmico tem suas concentrações ilustradas na Figura 32. Se considerarmos que a concentração inicial da HQ foi de aproximadamente 9 ug/mL, de acordo com a equação 1, a HQ perdeu 10% da sua concentração inicial e está fora do prazo de validade em aproximadamente 87 horas, porém, apesar de quantitativamente a HQ não possuir mais concentração suficiente para garantir o prazo de validade, pois está com menos de 90% da sua concentração inicial, o creme não apresentou coloração amarronzada característica da presença da BQ, produto de

degradação da HQ. O uso de metabissulfito de sódio como sistema antioxidante para a HQ é adotado pela indústria que fabrica e comercializa seu produto de referência.

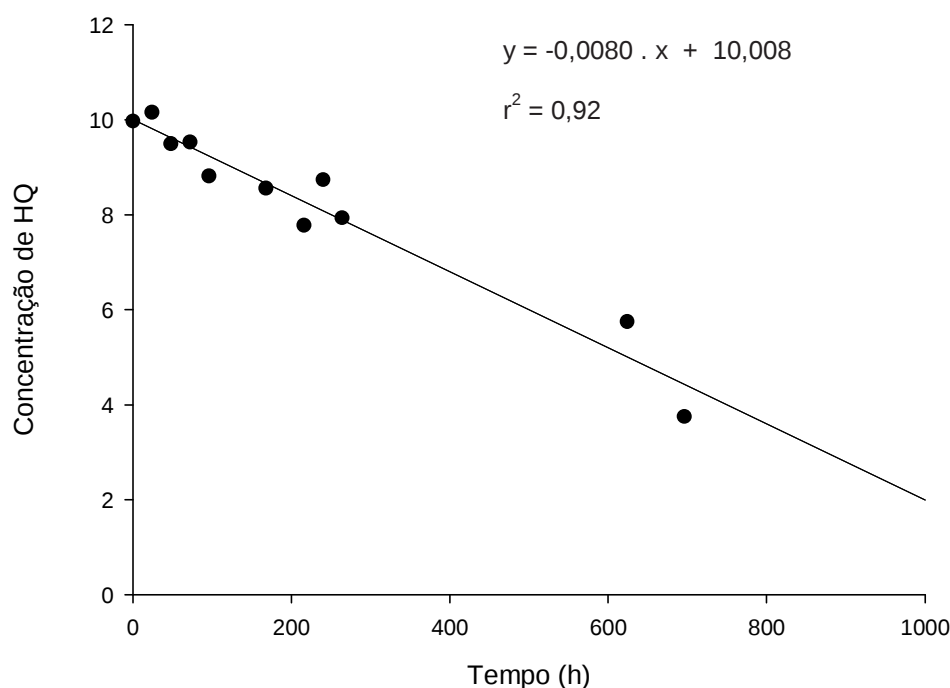


Figura 33: Decomposição da HQ contendo ácido α lipóico como sistema antioxidante a 45°C.

Na avaliação da estabilidade de HQ com sistema antioxidante composto por ácido α lipóico, de acordo com o gráfico apresentado na Figura 33, e a partir da equação 1, observou-se que a HQ perdeu 10% da concentração correspondente a quantidade de fármaco exigido para garantir o prazo de validade em torno de 125 h, assim como aconteceu quando o antioxidante utilizado foi o metabissulfito de sódio, e sua concentração aproxima-se de zero em aproximadamente 700 h após o início do experimento. Com base nessas informações pode-se presumir que para manter a prazo de validade, tanto o metabissulfito de sódio, quanto o ácido α lipóico mostraram-se eficientes, sendo que o ácido α lipóico mostrou-se mais eficiente que metabissulfito de sódio em torno de 47,5%

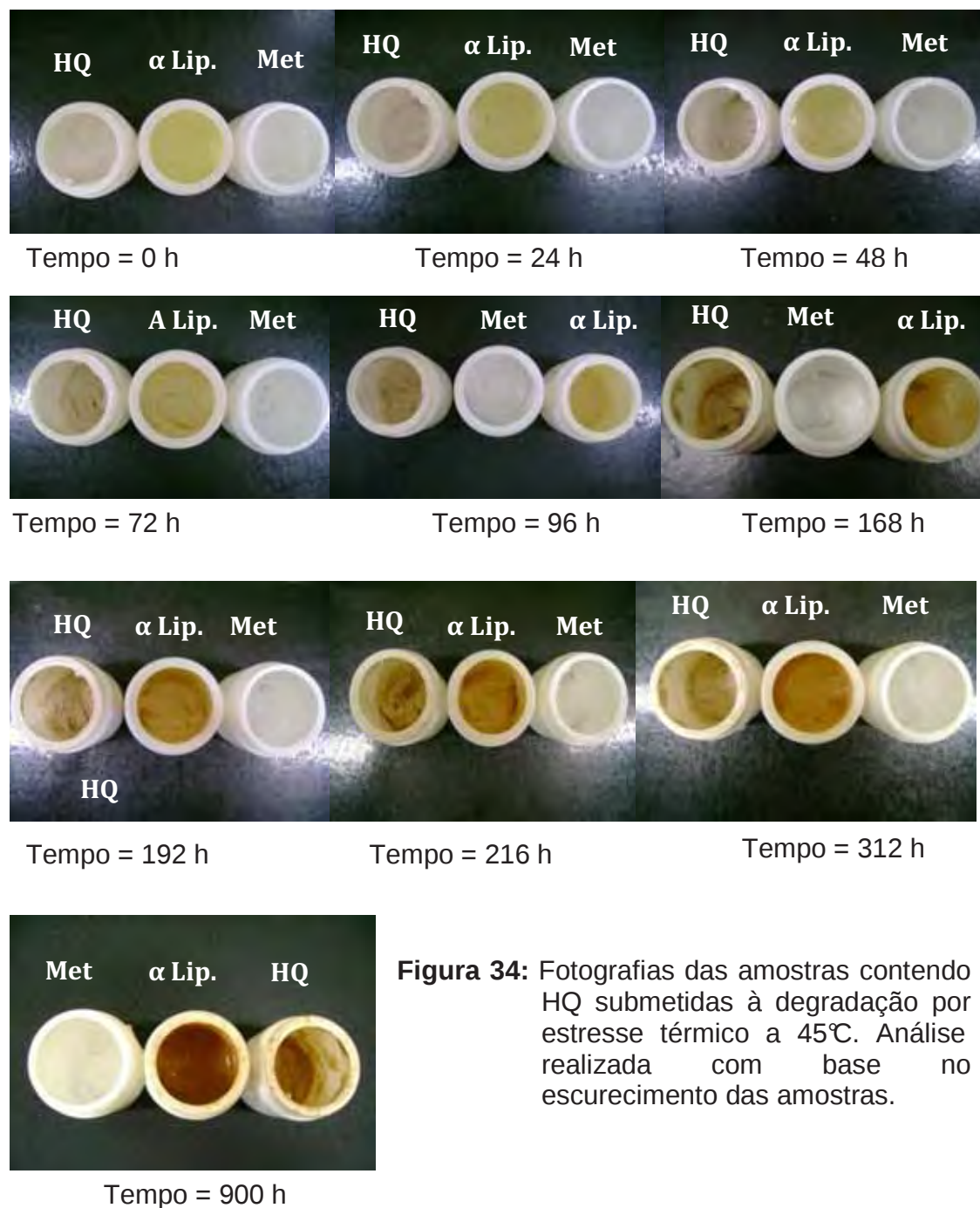
Avaliação visual da decomposição da HQ a 45°C.

Figura 34: Fotografias das amostras contendo HQ submetidas à degradação por estresse térmico a 45°C. Análise realizada com base no escurecimento das amostras.

A Figura 34 apresenta fotografias tiradas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 168, 192, 216, 312 e 900 h. Pode-se observar que a degradação apresentada pela mudança da coloração do cremes (de branco, no caso de metabissulfito e da HQ,

e de amarelo claro no caso de ácido α lipóico), para colorações mais escuras em tons amarronzados, caracterizando a decomposição da HQ e possível formação de BQ.

Além disso, pode-se observar que o metabissulfito manteve a formulação mais estável comparando-se ao creme contendo ácido α lipóico que apresentou certa instabilidade física a partir de 312 h, tornando-se mais fluido, comprando-se com o produto no início do ensaio. A amostra contendo metabissulfito permaneceu com sua coloração inicial até o final do ensaio, e podemos afirmar que a 45°C, apesar de não haver escurecimento da amostra, ocorreu a degradação da HQ como foi comprovado pela quantificação espectrofotométrica das amostras.

Com bases nessas informações, pode-se afirmar que somente o ensaio visual não é parâmetro para garantir que houve ou não oxidação da HQ.

Estabilidade da HQ a 30°C

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2002), a temperatura ambiente para a região dos trópicos é de 30°C. Por isso determinou-se a constante de velocidade de degradação (K) e o prazo de validade da HQ nesta temperatura.

O ensaio de estabilidade da HQ em creme à temperatura de 30°C foi realizada somente com a HQ, sem antioxidante.

A Figura 35 apresenta o perfil de degradação da HQ.

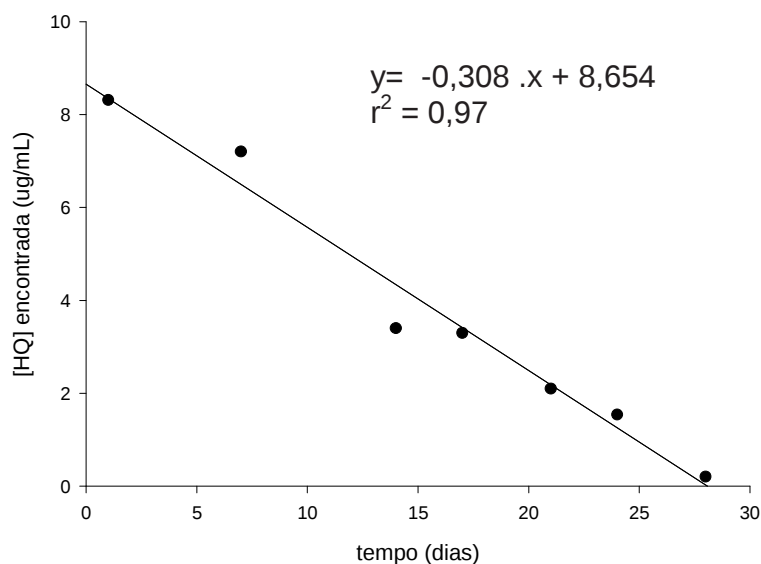


Figura 35: Perfil de decomposição da HQ em creme a 30°C

O perfil de degradação apresentou linearidade em relação à decomposição da concentração de HQ em razão do tempo, o que significa que a velocidade da reação independe da concentração da HQ, caracterizando a reação como zero ordem (PRISTA et al., 1995), na qual fatores externos, tais como a luz e a presença de oxigênio na amostra influenciam na velocidade de reação. Como a constante da velocidade de reação para zero ordem é a inclinação da reta, tem-se que K é igual a 0,308.

Determinação do prazo de validade

Uma vez que se conhece K e a ordem da reação é possível estimar o prazo de validade, utilizando a equação correspondente à ordem de reação. Como no ensaio de estabilidade à temperatura ambiente, a HQ em creme apresentou reação de zero ordem, o prazo de validade pode ser calculado de acordo com a equação 1.

Tem-se, assim, que o prazo de validade para o creme contendo 2% de HQ, sem qualquer sistema antioxidante é de aproximadamente três dias, uma vez que esteja armazenado à temperatura ambiente.

Como citado anteriormente, a temperatura é de fundamental importância para a determinação da velocidade da reação de oxidação da HQ. Um artifício que pode ser utilizado para aumentar este prazo de validade é manter o creme sob refrigeração, o que diminuiria a velocidade de degradação do fármaco e conseqüentemente aumentaria o prazo de validade do mesmo.

Conclusões

CONCLUSÕES

A partir das observações baseadas nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- O método de quantificação de HQ em creme para estudo de estabilidade utilizando álcool etílico como solvente não foi analiticamente adequado, pois apesar de a metodologia ter sido validada, não foi levado em conta os produtos de degradação que se formam durante o estudo de estabilidade. Esta metodologia pode ser novamente testada, pois possui baixo custo, contudo deve-se analisar o ponto de *zero crossing* para a BQ e só então proceder as análises. Por outro lado, esta metodologia pode ser utilizada para controle de qualidade em produtos recém acabados, nos quais não houve formação do produto de degradação.
- O método de quantificação de HQ em creme que utiliza o ácido sulfúrico como solvente não apresentou resultados satisfatórios, possivelmente pela composição do creme.
- O método de quantificação de HQ em creme para estudo de estabilidade utilizando metanol como solvente mostrou-se analiticamente satisfatório, pois foi validado e permitiu a quantificação da HQ na presença da BQ.
- À 55°C ,o VC IP apresentou menor porcentagem de de composição da HQ que o ácido α lipóico, mas, por apresentar o mesmo perfil que a HQ sem antioxidante, o VC IP não pode ser considerado um antioxidante adequado para este tipo de formulação.
- O metabissulfito foi o antioxidante que manteve a melhor estabilidade da forma farmacêutica.
- O prazo de validade previsto para a HQ foi verificado com a metodologia que utiliza metanol como solvente foi de aproximadamente 24 horas para a HQ sem antioxidante, 87 horas para a HQ com metabissulfito de sódio como sistema antioxidante e

125 para a HQ com ácido α lipóico quando expostos à temperatura de 45°C. A 30°C a HQ foi avaliada apenas sem antioxidante e apresentou prazo de validade de aproximadamente 3 dias.

Referências Bibliográficas

ADAMIS, G.; PAPAIOANNOU, M. G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; GARGALIANOS, P. KOSMIDIS, J. ; GIAMARELLOU, H. Pharmacokinetic interactions of ceftazidime, imipinem and azetreonam with amikacin in healthy volunteers. **Int. J. Antimicrob Agents**. V 23, p. 144-149, 2004.

AGACHE, P. **Histophysiologie du derme**. In: Physiology de la peau et explorations fonctionnelles cutanées. Paris: Editions médicales internationals, 2000.

AMER M, METWALLI M. Topical hydroquinone in the treatment of some hyperpigmentary disorders. **Int J Dermatol**. 37: 449-50, 1998.

ASTNER, S and ANDERSON, R. R. Remembering Thomas B. Fitzpatrick. **J of Investig Dermatol**, 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/jid/journal/v122/n2/full/5602158a.html>

BOLDRINI, F. **Obtenção e caracterização do complexo molecular hidroquinona/beta-ciclodextrina e estudo do uso dermatológico**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RE nº 485**, de 19 de março de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899**, de 29 de maio de 2003

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004.

BRITTAI, H. G. **Validação de métodos analíticos não cromatográficos**. Pharm.Tech., Ed. Bras., São Paulo v.2, n.3, 1998.

BUDAVARI, S. **The Merck Index**. 12. Ed. Whitehouse Station: Merck,1996.

CONNORS, K.A. **Chemical Stability oh Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmaceuticals**. 2 Th Ed, New York: John Wiley e Sons, 1986.

DE CAPRIO, A.P. The toxicology of hydroquinone-relevance to occupational and environmental exposure. **Crit. Rev. Toxicol.** V.133, p.349-357, 1995.

DOOLEY, T.P. Topical skin depigmentation agents, current products and discovery of a novel inhibitor of melanogenesis. **J. Dermatol. Treat.** v.8 p.275-279, 1997.

ENGASSER, P. G.; MAIBACH, H. I. Cosmetics and dermatology: Bleaching creams. **J.Am. Acad. Dermatol.** , v.5, 1981.

FDA. **Guidance for industry: Q2Bvalidation of Analytical Procedures: Methodology**, 1996.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 2 ed. Juiz de Fora, 2002.

GENNARO, A. R. **Remington: The scienceand practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: Lippincott: Williams e Wilkins, 2000.

GIL, E. S.; BAPTISTA FILHO, R.O.P. Estabilidade de fármacos e medicamentos. In: GIL, E. S.; ORLANDO, R.M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. **P. Controle físico químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Udinerp, 2005.

GÖNÜLLÜ, U.; YENER, G.; ÜNER, M.; INCEGÜL, T. Moisturizing potentials of ascorbyl palmitate and calcium ascorbate in various topical formulations. **Int. J. Cosm, Sci.**, v.26, p.31-36, 2003.

GUEVARA, I.L.; PANDAYA, A. G. Melasma treated with hydroquinone, tretinoin and a fluoinated steroid. **Int. J. Derm.**, v. 40, p. 212-215, 2001.

GUEVARA, I.L., PANDAYA, A. G. Safety and efficacy of 4% hydroquinone combined with 10% glycolic acid, antioxidants, and sunscreen in the treatment of melasma. **Int. J. Derm.**, v. 42, p. 966-972, 2003.

GUPTA, A.K., GOVER, M.D., NOURI, K. TAYLOR, S. The treatment of melasma: A review of clinical trials. **J Am Acad Dermatol.** vol 55, N. 6, 2006.

FESSENDEN, R. J.; FESSENDEN, J. S. **Organic Chemistry.** 6 ed. Pacific Groove: Brooks/Cole, 1998.

HURLEY ME, GUEVARA IL, GONZALES RM, PANDYA AG. Efficacy of glycolic acid peels in the treatment of melasma. **Arch Dermatol.**138:1578-82,2002.

JAVAHERI,S.M. ,HANDA, S., KAUR, I., et al. Safety and efficacy of glycolic acid facial in peel in Indian women with melasma. **Int. J. Dermatol.** v.40, p. 354-357, 2001.

JULIANO, C., COSSU, M., ALAMANNI, M.C., PIU, L. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **Int. J. Pharmac.** V. 299, p. 146–154, 2005.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 7 ed. Ed Guanabara Koogan, 1990.

KATSAMBAS, K.; ANTONIOU, C. Melasma: Classification and treatment. J. **Euro. Acad. Dermatol. Venerology.**, v.4, p.217-2231, 1995.

KATSAMBAS A, ANTONIOU C, KATSAROU A, STRATIGOS J, **Melasma: A Clinical Study of 210 Patients**. 17th World Congress of Dermatology; Volume of Abstracts, 177-178, 1987.

KIM, E.H., KIM, Y.C., LEE, E., KANG, H.Y. The vascular characteristics of melasma. **J of Derm Sci** 46, 111—116, 2007.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A. ; KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. I e II, 2001.

GARCIA, P. L. ; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. ; SANTORO, M. I. R. M. ; SINGH, A. K. . Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel and cream preparations. **J. Pharm and Biom Anal** , Amsterdam, v. 39, n. 3-4, p. 764-768, 2005.

MAYENA, L. , STUSSI, I., GAEL, S. Composto branqueador com extrato de *Waltheria indica* e Ácido Ferúlico. **Cosmet&Toil**. v. 16, p.58-62, 2004.

MANDHAM, M.; DENNEY, R.C.; BARNES, J.D.; THOMAS. **VOGEL Análise Química Quantitativa**. Tradução AFONSO, J.C.; AGUIAR, P.F.; ALENCASTRO, R.B. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2002. 462p.

MINORI UCHIMIYA, M., STONE, A. **Redox reactions between iron and quinones: Thermodynamic constraints**. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 1388–1401,

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1972.

MORRISON, R. T. **Química orgânica**. 12 ed. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1995

NICOLETTI, M.A. , ORSINE, E. M. A., DUARTE, A.C.N., BUONO, G.A. **Hipercromias: Aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. Cosmet&Toil**. v. 14, p.46 - 53, 2002.

PALUMBO A, D'ISCHIA M, MISURACA G, PROTA G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. **Biochim Biophys Acta** .1073:85-90, 1991.

PATHAK MA, FITZPATRICK TB, KRAUS EW. Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. **J Am Acad Dermatol**. 15:894-9, 1986.

PARVEZ, S., et al. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents **Phytother. Res.** 20, 921–934, 2006

PASCHOAL, L. R. ; FERREIRA, W. A. . Simultaneous determination of benzocaine and cetylpyridinium chloride in tablets by first-derivative spectrophotometric method. *Il Farmaco*, Itália, v. 55, n. 11-12, p. 687-693, 2000.

PASCHOAL, L. R. ; VILELA, A. P. O. ; PRADO, M. R. D. ; FERREIRA, W. A. . Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multi-componentes. **Rev. Bras. Ciên Farm**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

PEREZ, L.E.E., MONCADA, B., CAZARES, J.P.C. A double-blind randomizes trial of 5% ascorbic acid vs.hydroquinone in melasma. **Int. J. Derm** v.43, p. 604-607, 2004.

PETIT, J.W.; PIÉRARD, G.E. Skin-lightening products revised. **Int J. Cosm. Sci.**, v.25, p. 169-181, 2003

PHARMA PRESS. Ano IV – julho/2005

PIAMPHONGSANT T. Treatment of melasma: a review with personal experience. **Int J Dermatol** 37:897-903, 1998.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gubenkian, 1995.

RENDON, M., BERNEBURG, M., ARELLANO, I. PICARDO, M. Treatment of melasma. **J Am Acad Dermatol**. vol 54, N. 5, 2006

SALIM A, RENGIFO-PARDO M, VINCENT S, CUERVO-AMORE L. MELASMA. IN: WILLIAMS H, BIGBY M, DIEPGEN T, HERXHEIMER A, NALDI L, RZANY B, editors. **Evidence-based dermatology**. London: BMJ Books; 2003.

SILVA, G.M., CAMPOS, P.M. Ascorbic acid and its derivatives in cosmetic formulations. **Cosmet.&Toil**. v. 115 p. 59-62, 2000.

SILVA, J.A.; LIMA, I.P.B. avaliação da influência do etanol e propilenoglicol como solventes sobre as características químicas e físico-químicas de uma formulação de creme de hidroquinona. **Infarma**, v.16, nº 13-14, 2005

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry**. 5 ed. New York: John Wiley&Sons, 2001.

SU, E.G. Formulando com branqueadores da pele: Proposição de uso de ingredientes despigmentantes. **Cosmet.&Toil**. v. 11 p. 57-63, 1999.

THOPMSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2001

USP 25. The United States Pharmacopeia. Rockville: USP Convention, 2002.

VADAS, E. B. **Estabilidade de produtos farmacêuticos**. In: GENNARO, A. R. (Ed.) Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

VAZQUEZ M, MALDONADO H, BENMAMAN C, SANCHEZ JL. Melasma in men: A clinical and histologic study. **Int J Dermatol** 27, 25-27, 1988.

YOUN, S.; PARK, K. C.; HUH, C. H.; BYUN, H. J.; CHOI, S. Y.; KIM, M. K.; PATEL, R. A.; SHINN, A. H. Evaluation of gender difference in skin type and pH. **J of Dermatol. Sci.** v 41, pag 153-156, 2006.

WESTERHOF, W; KOOYERS, T. J. **Hydroquinone and its analogues in dermatology – a potential health risk**. **J. Cosm. Dermatol.** 4, 55–59, 2005.

WICKETT, R.R., VISSCHER, M.O. **Structure and function of the epidermal barrier**. *Ajic*. Vol. 34 No. 10 Supplement 2, 2006.

WOLF R, WOLF D, TAMIR A, POLITI Y. Melasma: a mask of stress. **Br J Dermatol.**125:192-3, 1991

Internet:

ADAM. Melanin, 2006. Disponível em:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9620.htm>. Consultado
aos 12 de abril de 2008.