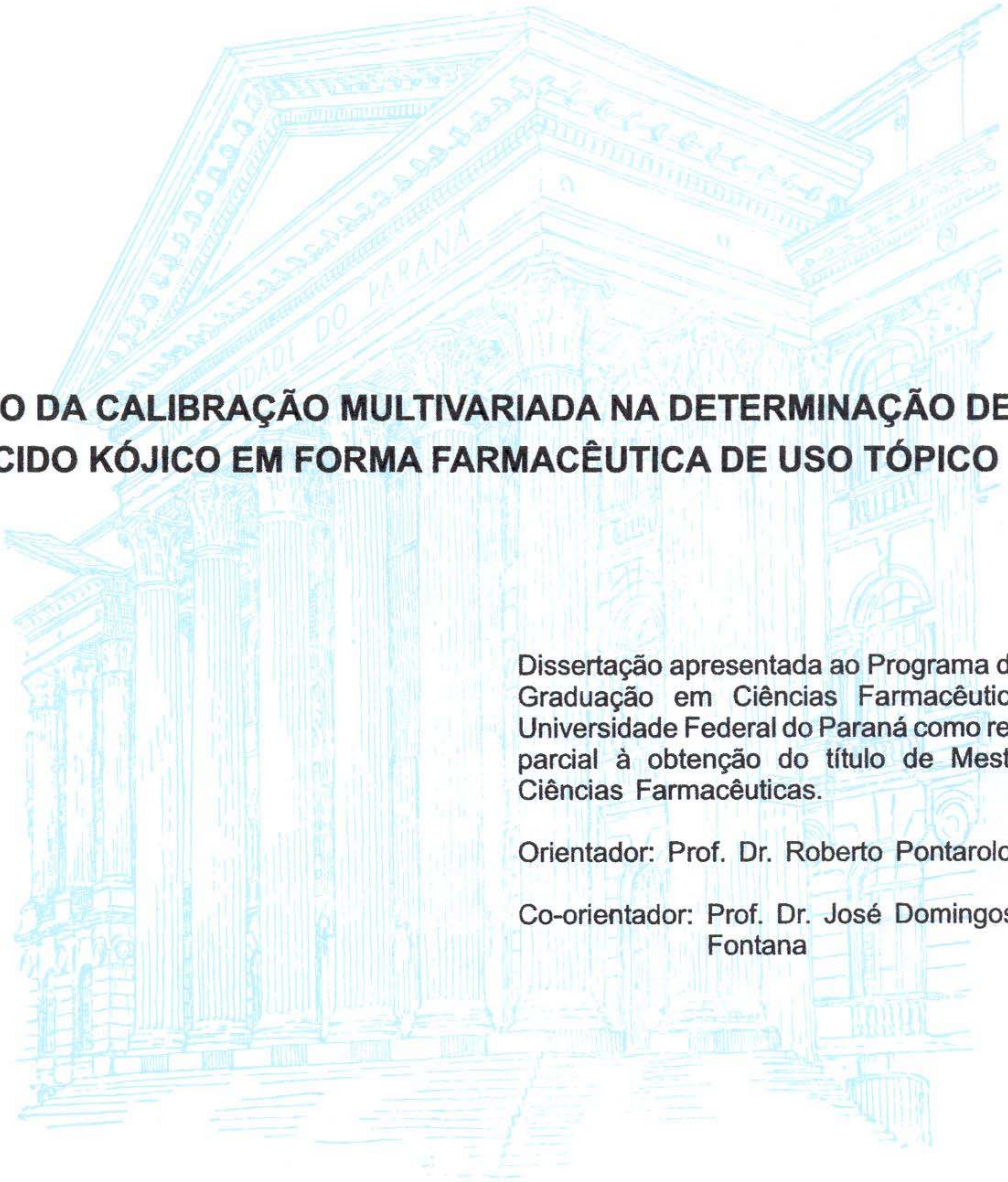
CASSYANO JANUÁRIO CORRER



USO DA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO EM FORMA FARMACÊUTICA DE USO TÓPICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

CURITIBA

2004

CASSYANO JANUÁRIO CORRER

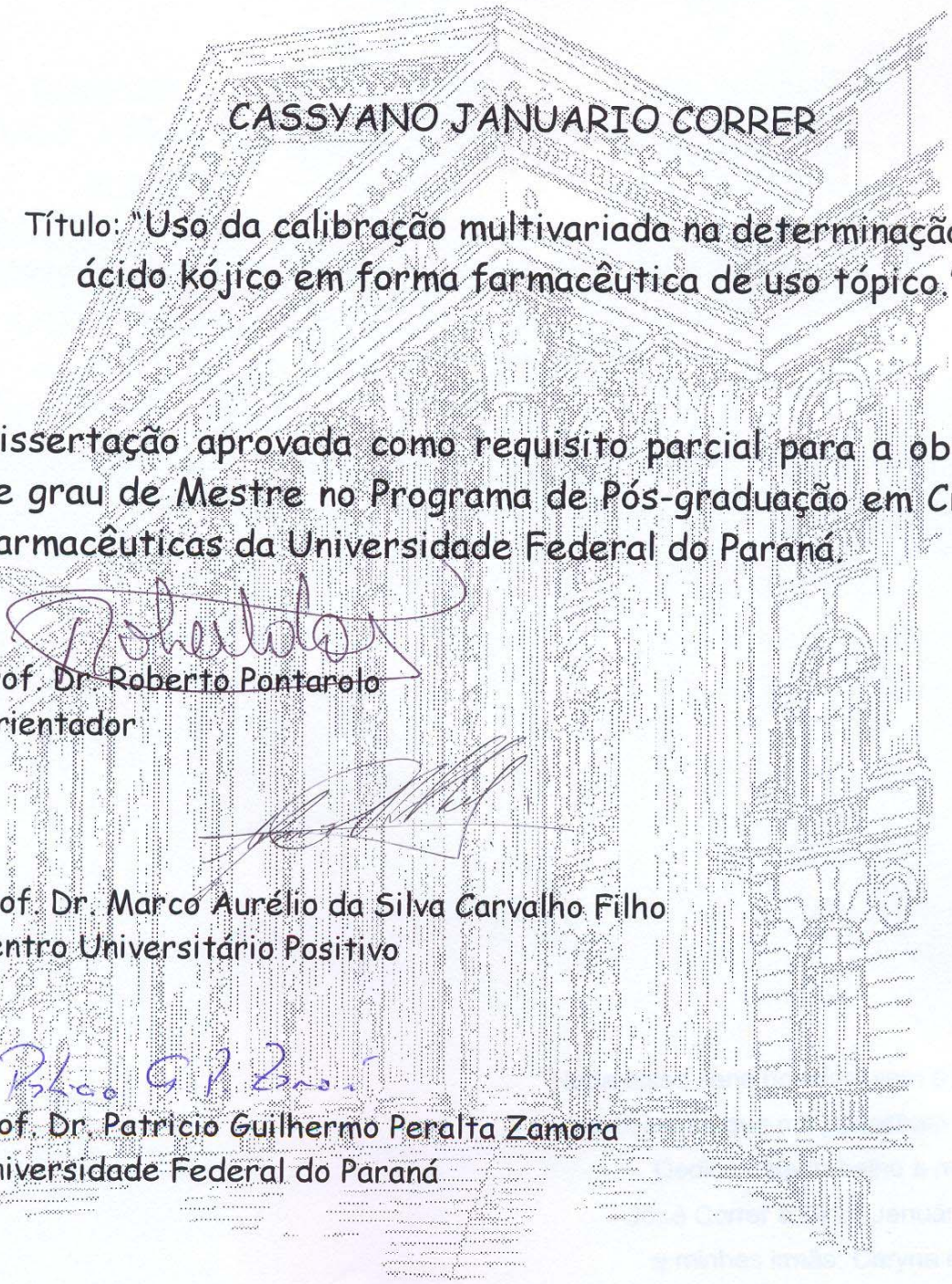
USO DA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO KÓJICO EM FORMA FARMACÊUTICA DE USO TÓPICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Co-orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

CURITIBA
2004

TERMO DE APROVAÇÃO



CASSYANO JANUARIO CORRER

Título: "Uso da calibração multivariada na determinação de ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico."

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador

Prof. Dr. Marco Aurélio da Silva Carvalho Filho
Centro Universitário Positivo

Prof. Dr. Patricio Guilhermo Peralta Zamora
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 16 de dezembro de 2004

Nada disso seria possível sem a presença
das pessoas que me permitiram escolher.
Dedico este trabalho a meus pais:
José Correr e Dirce Januário Correr;
e minhas irmãs: Caryna e Camyla.

“Somos aprendizes de uma arte na qual ninguém se torna mestre.”

Hernest Hemingway (1898-1961)

AGRADECIMENTOS

Quando chega ao fim um trabalho de dois anos, representado essencialmente por pouco mais de cem páginas escritas de uma dissertação, surge estranhamente uma sensação de incompletude; questionadora do significado e significância de tantas expectativas, ansiedade e esforço.

Fica claro depois que tudo vale a pena e que o caminho tinha mesmo que ser percorrido. Tinha, pois compartilhar com tanta gente, dividir sentimentos e aprender a ajudar e a ser ajudado deve fazer parte da formação de qualquer ser humano. Nessa hora, cabem muitos agradecimentos.

Em primeiro, agradeço ao Prof. Roberto Pontarolo, que desde as aulas do nivelamento nos brindou com pensamentos brilhantes, ensinando a arte da não representação do conhecimento. E depois, como orientador, me deu a liberdade de atuar sob poucas amarras, respeitando minhas convicções e planos, e me permitindo ultrapassar minhas muitas limitações. Obrigado professor!

Agradeço muitíssimo também ao Prof. José Domingos Fontana, pelo privilégio de sua confiança, que senti desde a etapa de entrevista, e pela honra e alegria da convivência, dentro e fora da universidade.

A duas pessoas que estão na base da minha formação profissional: Airton Petris e Adriana Ivama. Vocês recomendaram a este programa que me aceitasse e isso muito me orgulha. Espero poder lhes agradecer pessoalmente em breve.

Tenho grande gratidão também pelas pessoas que, além de meus orientadores, gentilmente colaboraram com os experimentos. São elas: Profª. Mayumi, Profª. Tânia, Waleska e, especialmente, ao Prof° Patrício Peralta-Zamora, Gilcélia Cordeiro e João Gaspareto. Muito obrigado também às farmacêuticas das farmácias magistrais que colaboraram com a pesquisa.

Ao pessoal do “clube das quintas”: Aline Davet, Mauro Cwiertnia, Júlio Machado e Suzane Virtuoso. Obrigado por me ensinarem livros, filmes, músicas, poesias, filosofia e amizade. Só posso dizer: Não vão se perder por aí!

Aos demais colegas próximos do mestrado que dividiram comigo este tempo, muito obrigado.

A um verdadeiro amigo distante, e tão perto. Fernando, você é fortemente responsável por eu ter chegado até aqui. Obrigado por me permitir crescer aprendendo com você.

E finalmente, a você Paula, que acompanha essa história desde meu primeiro dia de aula no curso de farmácia da Universidade Estadual de Londrina. Tantos anos de convivência e cumplicidade fazem pobre qualquer agradecimento. Obrigado, simplesmente, por continuar por perto.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS x
LISTA DE FIGURAS xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS xv
RESUMO xvi
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 5
2.1 OBJETIVO GERAL 5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
3.1 A PELE 7
3.1.1 Estrutura e Função 7
3.1.2 O Processo Melanogênico 9
3.2 DISCROMIAS 14
3.2.2 Melanose Actínica 16
3.2.3 Melasma 16
3.2.4 Hipercromias Medicamentosas 17
3.2.5 Melanodermias Tóxicas 17
3.2.6 Nevos Melanocíticos Comuns 17
3.2.7 Fitofotodermatoses 18
3.3 AGENTES DESPIGMENTANTES 18
3.3.1 Hidroquinona 19
3.3.2 Tretinoína 20
3.3.3 Corticosteróides 20
3.3.4 Ácido Azeláico 20
3.3.5 Ácido Fítico 21
3.3.6 Ácido Ascórbico 21
3.3.7 α- e β-Hidroxiácidos 21
3.3.8 Ácido Kójico 22

3.3.8.1 Métodos de quantificação do ácido kójico 26
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 28
3.4.1 Especificidade 30
3.4.2 Intervalo 30
3.4.3 Linearidade 31
3.4.4 Exatidão 31
3.4.5 Precisão 32
3.4.6 Robustez 33
3.4.7 Sensibilidade 34
3.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA 34
3.5.1 Princípios 36
3.5.2 Métodos de Calibração 40
3.5.2.1 Regressão Linear Múltipla (RLM) 41
3.5.2.2 Regressão em Componentes Principais (PCR) 42
3.5.2.3 Mínimos Quadrados Parciais (PLS) 43
3.5.3 Validação do Modelo de Calibração 45
3.5.3.1 Escolha do Número de Variáveis Latentes 46
3.5.3.2 Previsão do Modelo de Calibração para Amostras Testes 47
3.5.3.3 Detecção de anomalias 47
3.5.4 Aplicações de Interesse Farmacêutico 48
3.6 ALGUNS CONCEITOS EM ESTATÍSTICA 49
4 MATERIAL E MÉTODOS 52
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PRESCRIÇÕES DE ÁCIDO KÓJICO 52
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL 52
4.2.1 Materiais e equipamentos 54
4.2.2 Planejamento de amostras testes 54
4.2.3 Obtenção dos espectros 56
4.2.4 Construção dos modelos de calibração 57
4.2.5 Comparação dos modelos de calibração 61
4.2.6 Validação do modelo de calibração 61

4.2.6.1 Especificidade 62
4.2.6.2 Linearidade 63
4.2.6.3 Intervalo 63
4.2.6.4 Precisão 64
4.2.6.5 Exatidão 65
4.2.6.6 Robustez 65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
5.1 PERFIL DAS PRESCRIÇÕES DE ÁCIDO KÓJICO 67
5.2 ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DO ÁCIDO KÓJICO 69
5.3 ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS TESTES 70
5.3.1 Amostras Padrão 70
5.3.2 Amostras Creme 71
5.4 MODELOS DE CALIBRAÇÃO 72
5.4.1 Modelo a partir de amostras padrão 72
5.4.1.1 Seleção da Faixa Espectral 72
5.4.1.2 Seleção de Variáveis Latentes 74
5.4.1.3 Avaliação de anomalias 76
5.4.1.4 Previsão de amostras padrão e creme 77
5.4.2 Modelo a partir de amostras creme 80
5.4.2.1 Seleção da Faixa Espectral 80
5.4.2.2 Seleção de Variáveis Latentes 81
5.4.2.3 Avaliação de anomalias 83
5.4.2.4 Previsão de amostras creme 84
5.4.2.5 Modelo a partir de amostras creme utilizando outra faixa espectral 86
5.4.3 Comparação dos modelos de calibração 93
5.5 VALIDAÇÃO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO 94
5.5.1 Exatidão 94
5.5.2 Especificidade 95
5.5.3 Linearidade e Intervalo 97
5.5.4 Precisão 97

5.5.5 Robustez 99
5.5.5.1 Influência da Temperatura 100
5.5.5.2 Influência do Tempo de Leitura 102
5.5.5.3 Influência do pH 105
5.6 Comparação com outros métodos validados 107
6 CONCLUSÕES 110
REFERÊNCIAS 112
ANEXO 1. Modelo de protocolo de pesquisa utilizado junto às farmácias magistrais. 121

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Síndromes hipercrômicas hereditárias predominantemente autossômicas dominantes..... 15
Tabela 1 - Relatos de ocorrência de ácido kójico. 23
Tabela 2 - Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. 29
Tabela 3 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico. 34
Tabela 4 - Esquema de diluições no preparo das amostras padrão utilizadas na construção do modelo de calibração. 55
Tabela 5 - Esquema de diluições no preparo das amostras creme utilizadas na construção do modelo de calibração..... 56
Tabela 6 - Esquema de diluições no preparo das soluções de ácido kójico utilizadas na construção da curva de calibração..... 62
Tabela 7 - Esquema de diluições no preparo das amostras utilizadas no ensaio de repetibilidade..... 64
Tabela 8 - Soluções creme de AK 20 μg/ml em diferentes valores de pH.... 66
Tabela 9 - Freqüência de associações de ácido kójico com outros agentes clareadores prescritas no período de maio a agosto de 2003 em Curitiba-PR (n=163)..... 69
Tabela 10 - Valores reais e encontrados das amostras padrão pelo modelo de calibração do conjunto de amostras padrão..... 77
Tabela 11 - Valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração do conjunto de amostras padrão..... 79
Tabela 12 - Valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração do conjunto de amostras creme..... 85
Tabela 13 - Valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração do conjunto de amostras creme, considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm e uma variável latente..... 90
Tabela 14 - Comparação entre os modelos multivariados a partir das amostras teste padrão e creme na previsão das amostras creme..... 93
Tabela 15 - Resultados do teor de ácido kójico no ensaio de recuperação pelo método multivariado..... 94
Tabela 16 - Porcentagens de recuperação de ácido kójico em amostras de creme por espectrometria multivariada e convencional..... 97
Tabela 17 - Resultados de determinação de ácido kójico em creme pelo modelo multivariado no ensaio de repetibilidade (intra-corrida)..... 98

Tabela 18 - Resultados determinação de ácido kójico em creme pelo modelo multivariado no ensaio de precisão intermediária (inter-corridas)..... 99
Tabela 19 - Resultados da determinação de ácido kójico em amostra creme em diferentes temperatura de obtenção dos espectros..... 101
Tabela 20 - Resultados da determinação de ácido kójico pelo método multivariado em amostra creme a partir de diferentes tempos de leitura..... 104
Tabela 21 - Comparação entre os métodos de quantificação do ácido kójico..... 108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele incluindo a localização dos melanócitos e a produção de melanina..... 10
Figura 2 - Cascata melanogênica..... 13
Figura 3 - Estrutura do ácido kójico..... 22
Figura 4 - Modelo Geral do Processo de Calibração Multivariada..... 37
Figura 5 - Matriz X utilizada na construção do modelo de calibração (linha x coluna)..... 38
Figura 6 - Matriz Y utilizada na construção do modelo de calibração (linha x coluna)..... 38
Figura 7 - Matrizes de espectros e concentrações que constituem o conjunto de calibração..... 39
Figura 8 - Fluxograma geral do desenvolvimento e validação de um método por calibração multivariada para determinação do ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico..... 53
Figura 9 - Freqüência de distribuição das concentrações de ácido kójico prescritas de forma isolada ou em associação no período de maio a agosto de 2003 em Curitiba-PR..... 68
Figura 10 - Espectro de absorção UV do ácido kójico. Solução aquosa 20μg/ml, T=25°C..... 70
Figura 11 - Espectros de absorção UV de soluções aquosas contendo ácido kójico 1,5-30,0μg/ml do conjunto de calibração de amostras padrão..... 71
Figura 12 - Espectros de absorção UV de soluções alcoólicas contendo ácido kójico 4,0-30,0μg/ml do conjunto de calibração de amostras creme. T=25°C..... 72
Figura 13 - Espectro de correlação (R2) para o conjunto de 10 amostras padrão..... 73
Figura 14 - Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função do número de variáveis latentes obtidas por validação cruzada do conjunto de amostras padrão considerando a faixa espectral de 200 a 300 nm..... 74
Figura 15 - Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras padrão obtidos a partir de duas variáveis latentes..... 75
Figura 16 - Análise de anomalias na construção do modelo de calibração a partir do leverage e resíduos de Student para o conjunto de amostras padrão..... 76
Figura 17 - Gráfico dos valores reais e encontrados das amostras padrão pelo modelo de calibração construído a partir do conjunto de amostras padrão..... 78

Figura 18 - Gráfico dos valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração construído a partir do conjunto de amostras padrão..... 79
Figura 19 - Espectro de correlação (R2) para o conjunto de 10 amostras creme..... 81
Figura 20 - Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função no número de variáveis latentes obtidas por validação cruzada do conjunto de amostras creme considerando a faixa espectral de 207 a 305 nm..... 82
Figura 21 - Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de duas variáveis latentes..... 83
Figura 22 - Análise de anomalias na construção do modelo de calibração a partir do leverage e resíduos de Student para o conjunto de amostras creme..... 84
Figura 23 - Gráfico dos valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração construído a partir do conjunto de amostras creme..... 86
Figura 24 - Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função no número de variáveis latentes obtidas por validação cruzada do conjunto de amostras creme considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm..... 87
Figura 25 - Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de uma variável latente, no intervalo de 250 a 290 nm..... 88
Figura 26 - Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de Student na construção do modelo de calibração para o conjunto de amostras creme, considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm e uma variável latente..... 89
Figura 27 - Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de duas variáveis latentes, no intervalo de 250 a 290 nm..... 91
Figura 28 - Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de duas variáveis latentes, no intervalo de 250 a 290 nm..... 92
Figura 29 - Curva padrão de soluções aquosas de ácido kójico padrão por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (leitura em 269nm)..... 96
Figura 30 - Comportamento espectral de solução contendo ácido kójico (20 µg/ml) em diferentes temperaturas..... 102

Figura 31 - Comportamento espectral de solução contendo ácido kójico (18 µg/ml) em diferentes tempos de leitura..... 103
Figura 32 - Comportamento espectral de soluções contendo ácido kójico (20 µg/ml) em diferentes valores de pH..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs - Absorvância
AK - Ácido kójico
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV - Coeficiente de variação
DP - Desvio padrão
DPR - Desvio Padrão Relativo (sinônimo de CV)
ICH - International Conference on Harmonization
MSEP - Erro médio de previsão
PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
PRESS - Soma dos quadrados dos erros de previsão
r - Coeficiente de correlação
r^2 - Coeficiente de determinação
RMSEP - Raiz quadrada do erro médio de previsão
UV - Ultravioleta
VIS - Visível

RESUMO

A calibração multivariada constitui uma ferramenta analítica que possibilita a determinação de fármacos em formas farmacêuticas, mesmo na presença de interferentes e utilizando toda informação química relevante obtida instrumentalmente. O ácido kójico é um agente clareador utilizado no tratamento de discromias para o qual não existe um método padrão de quantificação em monografias oficiais. A determinação desse fármaco por espectrofotometria convencional apresenta limitações de especificidade ou baixa sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método por calibração multivariada para quantificação de ácido kójico em creme. Construiu-se um modelo multivariada por método PLS tendo como conjunto de calibração soluções de ácido kójico, no intervalo de 4 a 30 µg/ml, preparadas a partir de creme a 2%. O modelo construído foi validado segundo critérios da Anvisa/ICH sob parâmetros de exatidão, precisão, linearidade e robustez. Os dados foram centrados na média e duas variáveis latentes explicaram 100,0% e 99,99% das matrizes x e y, respectivamente. Foram analisados resíduos de student e leverage, não se encontrando amostras anômalas no conjunto de calibração. Os experimentos demonstraram que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade na faixa de trabalho calibrada. Ensaios de robustez mostraram que o modelo não sofre influência do tempo de leitura das amostras, sendo sensível, no entanto, a variações de pH e temperatura.

Palavras-chaves. Ácido kójico. Espectrofotometria. Validação de método analítico.

Calibração multivariada.

ABSTRACT

The multivariate calibration is an analytical tool that makes possible the analysis of drugs presented in pharmaceutical forms, even existing interfering substances, by using all chemical information instrumentally gathered. The kojic acid is a pigmentation-lowering agent, used in the treatment of hyperpigmentation, without a standard method of quantification in official monographs. The determination of this drug thorough conventional spectrophotometry presents limitations by non-specificity and by low sensitivity. The objective of this study was to develop and validate a multivariate calibration method for quantification of kojic acid in a cream form. A PLS multivariate model, with a standardized set of solutions of kojic acid in the interval of 4 the 30 µg/ml, being prepared from a 2% cream was constructed. The constructed model was validated according to criteria of Anvisa/ICH under parameters of accuracy, precision, linearity and robustness. Data were centered to the average and two latent variables had explained 100,0% e 99.99% of X and Y matrix, respectively. On not finding anomalous samples in the set of calibration, residues of student and leverage had been analyzed. The trial had demonstrated that the method presents accuracy, precision and linearity in the calibrated band of work. Assays of robustness had shown that the model does not suffer influence from the time of reading of the samples, however, being sensible the variations of pH and temperature.

Key-words. Kojic acid, spectrophotometry, analytical method validation, Multivariate calibration.

1 INTRODUÇÃO

O profundo impacto do avanço científico-tecnológico do último século sobre todas as áreas do conhecimento é algo já amplamente discutido e notório. Graças a essa revolução, vivemos hoje a chamada “era da informação”, fruto dos avanços principalmente na área da informática. Todo processo produtivo ou de serviços, em maior ou menor grau, tem hoje sua qualidade apoiada em recursos de *software* e *hardware* que permitem o alcance de resultados antes muito limitados.

Na área farmacêutica, e mais especificamente na área de controle de qualidade de medicamentos, essas novas ferramentas ampliaram as possibilidades analíticas, particularmente na determinação da concentração de fármacos em formas farmacêuticas. A calibração multivariada representa uma dessas ferramentas, e faz parte de uma disciplina da química que remonta à década de 70, denominada quimiometria.

A quimiometria agrupa métodos de análise estatística, inteligência artificial e modelamento matemático, com propósito de construir procedimentos e experimentos otimizados na aquisição e análise de dados químicos, a partir dos quais se poderão obter informações de interesse, como identificação ou quantificação de substâncias (MASSART et al.,1988). A principal vantagem dessas técnicas é a possibilidade de se trabalhar com uma quantidade imensa de dados, o que seria impossível manualmente. O resultado será um método que considera o sistema químico em sua totalidade e complexidade, e não apenas em alguma de suas características.

Entre os métodos comumente utilizados na determinação de fármacos está a espectrofotometria. Este método considera a propriedade de absorção da luz por parte das substâncias, utilizando essa capacidade como forma de “registrar” seus comportamentos e determinar outras propriedades de interesse proporcionais a eles. Na técnica convencional, a absorção da substância na região do ultravioleta e visível do espectro, por exemplo, podem ser correlacionadas (por análise de

regressão linear simples) às suas concentrações na amostra. Esse método é chamado univariado, pois considera normalmente a absorção em um único comprimento de onda do espectro. Justamente essa condição constitui a principal causa de limitações da técnica, na medida em que a sujeita à interferência de outros constituintes da amostra. Em medicamentos, a presença do princípio ativo junto aos excipientes freqüentemente limita sua quantificação por esse caminho.

Na calibração multivariada, o que se pretende é construir um modelo matemático que possa considerar não a absorção da substância em um único comprimento de onda, mas em todos os comprimentos de onda úteis. O que se tenta é estabelecer uma relação entre dois blocos de informação química disponível, o das medidas instrumentais (ex. espectros) e o da propriedade calibrada (ex. concentração) (BEEBE & KOWALSKI, 1987). Este método amplia as possibilidades de análise e tem grande potencial de aplicação no meio farmacêutico.

Aliada a essa busca por novos caminhos de análise química, também a qualidade dos métodos desenvolvidos é de grande importância ao processo de produção e controle. Sob essa ótica, a validação dos processos, métodos e ferramentas deve ser considerada no desenvolvimento de qualquer nova tecnologia.

A validação de um método analítico tem por objetivo fundamental assegurar a confiabilidade dos resultados de uma análise. Entre os esquemas de validação (USP, 1999) estão as determinações quantitativas de matéria-prima ou princípio ativo de especialidades farmacêuticas, a determinação de impurezas em matérias-primas ou produtos de degradação em especialidades farmacêuticas, a determinação de características de performance e os testes de identificação. Os parâmetros analíticos típicos considerados em um processo de validação são: precisão, exatidão, especificidade, linearidade, faixa de trabalho, reprodutibilidade, robustez e sensibilidade (GREEN, 1996).

O ácido kójico (AK) [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona] é uma substância natural produzida por vários tipos de fungos e bactérias, entre elas espécies de *Aspergillus, Penicillium e Acetobacter* (NOHYNEK *et al.*, 2003). Entre suas propriedades destacam-se a ação antimicrobiana e quelante de íons cobre. Esta última, responsável por sua ação inibitória sobre a tirosinase, interfere na cascata melanogênica reduzindo a produção de eumelanina, de ação pigmentante (CABANES *et al.*, 1994). Esse mecanismo confere ao AK ação clareadora, permitindo seu uso em preparações cosmecêuticas utilizadas no tratamento tópico das discromias (modificações na coloração normal da pele por diferenças quantitativas de pigmentos) (FONSECA & SOUZA, 1986). Diversas formulações contendo AK em diferentes concentrações são utilizadas no Brasil em tratamentos dermatológicos, tendo sua origem predominante na manipulação magistral em farmácias de manipulação.

Não há um método de referência para determinação de ácido kójico. Diversos métodos encontram-se descritos em literatura, porém focados na análise de alimentos ou produtos de fermentação. Considerando, no entanto, a boa absorção na região do ultravioleta por essa substância, o uso de técnicas espectrofotométricas surge como uma solução relativamente simples a essa lacuna.

Atualmente, dois métodos espectrométricos encontram-se avaliados. Um deles utiliza espectrometria ultravioleta convencional para quantificação do ácido kójico em matérias primas e formulações (GOMARA et al., 2004). Este método tem como limitação uma baixa especificidade na presença de interferentes, como o metilparabeno. Outro método desenvolvido e validado utiliza a complexação do AK com cloreto férrico como estratégia de superação dessa interferência. O resultado é um método válido mais específico, porém pouco sensível (GOMARA, 2003).

As novas possibilidades de análise por calibração multivariada, a necessidade de exploração dessa técnica e as características desse agente clareador motivaram a realização deste trabalho. Sua contribuição pretende ser o

oferecimento de uma nova possibilidade analítica para determinação de ácido kójico e a motivação para o desenvolvimento de métodos analíticos para outras substâncias, em outros cenários, utilizando-se modelos multivariados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e visível (VIS) utilizando modelo de calibração multivariada para o [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona], conhecido como ácido kójico, em preparação magistral dermatológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar um levantamento das concentrações de ácido kójico mais utilizadas, a freqüência com que este é prescrito com relação a outros agentes clareadores e quais as associações mais comuns.

Desenvolver um modelo de calibração multivariada a partir de soluções aquosas de ácido kójico padrão de referência.

Desenvolver um modelo de calibração multivariada a partir de soluções de ácido kójico padrão preparadas a partir de forma farmacêutica de uso tópico (creme).

Avaliar comparativamente os métodos multivariados desenvolvidos e validar o de melhor desempenho conforme parâmetros de especificidade, linearidade, Intervalo, exatidão e precisão estabelecidos por recomendações nacionais e internacionais.

Avaliar a robustez do método analisando a influência do pH, temperatura e tempo de leitura das amostras.

Comparar as características do método final validado com os métodos convencionais já validados por outros autores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A PELE

3.1.1 Estrutura e Função

A pele do ser humano, que corresponde a 15% de seu peso corporal, é um órgão externo que reveste e delimita o organismo protegendo-o, por meio das inúmeras funções de relação com o meio exterior (AZULAY & AZULAY, 1999a). A pele se compõe de duas camadas: a epiderme e a derme. Abaixo delas está o tecido subcutâneo, denominado hipoderme ou panículo adiposo. A epiderme é a camada externa, diretamente exposta ao ambiente, e formada por um arranjo ordenado de células denominadas queratinócitos. A derme é a camada interna e seu principal componente é o colágeno. Ela está localizada sobre a hipoderme, composta, principalmente, de lóbulos de lipócitos ou células adiposas (ARNOLD, ODOM & JAMES, 1994a).

A pele tem como função principal a manutenção do equilíbrio com o meio exterior. Segundo AZULAY & AZULAY (1999), destacam-se, ainda, as seguintes funções específicas:

- *Proteção*: É exercida contra as agressões do meio exterior. A pele possui resistência relativa a agentes mecânicos, tem a propriedade de absorver parcialmente raios ultravioleta (UV), colabora na manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, do pH ácido (5,4-5,6) da camada córnea, além de prover proteção imunológica e química.

- *Percepção*: Os elementos nervosos presentes sobretudo na derme permitem ao ser humano o reconhecimento de sensações como calor, frio, dor e tato, importantes no processo de defesa.

- *Hemorregulação e termorregulação*: A pele, por meio de seus extensos plexos vasculares e glomos atua na manutenção do débito sanguíneo periférico. Além disso, por mecanismo comandado pelo centro termorregulador do sistema nervoso autônomo, a pele colabora sensivelmente no controle da temperatura corpórea, em processos que envolvem vasoconstrição e vasodilatação. As glândulas sudoríparas também desempenham importante papel nessa função.

- *Secreção*: Como elementos secretados tem-se a queratina, a melanina, o sebo e o suor, todos exercendo funções definidas e harmônicas.

- *Excreção*: As glândulas écrinas (ex. sudoríparas) secretam água e eletrólitos, não possuindo, porém, papel comparável ao dos rins.

- *Metabolização*: A pele também sintetiza hormônios (testosterona) e é capaz de metabolizar testosterona, progesterona, estrógenos e glicocorticóides. Tem também ação decisiva na produção e ativação da vitamina D.

Ainda considerando o aspecto estrutural, a epiderme de uma pessoa adulta compõe-se de três tipos básicos de células: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans, possuindo estas últimas papel na indução de rejeição ao enxerto, na sensibilização e na imunovigilância (AZULAY & AZULAY, 1999a). Os queratinócitos, também chamados células escamosas, possuem a função específica de produzir queratina, um complexo filamentoso protéico que, além de formar a camada exterior (extrato córneo) da epiderme, é também a proteína estrutural dos pêlos e unhas (ARNOLD, ODOM & JAMES, 1994a).

Os melanócitos são as células de pigmentação da epiderme. Eles se originam da crista neural e podem ser encontrados dentro da epiderme fetal já na oitava semana de desenvolvimento (ARNOLD, ODOM & JAMES, 1994a). Estas

células têm como papel primordial produção de melanina, cujo processo de biosíntese (chamado melanogênese) e funções serão detalhadas a seguir.

3.1.2 O Processo Melanogênico

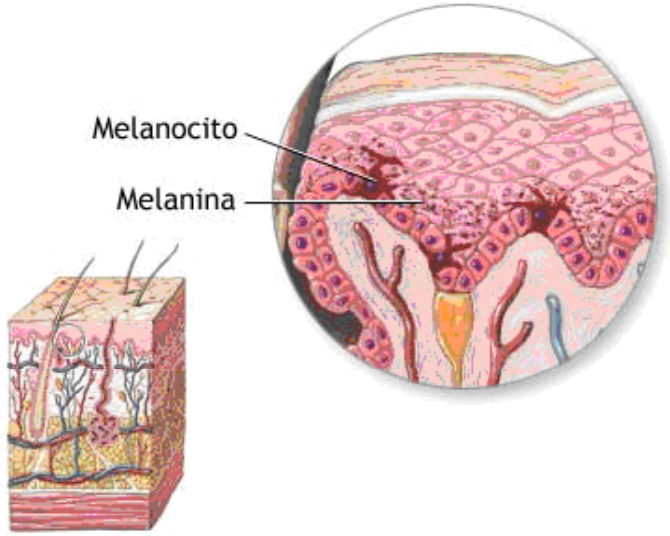
A cor da pele é resultado da presença e interação de uma série de substâncias presentes da epiderme e derme denominadas cromóforos, sendo a melanina o complexo mais importante (YOON *et al.*, 2003). Entre eles, a oxihemoglobina (vermelho brilhante), a hemoglobina reduzida (vermelho bluish) e a bilirrubina (amarelo) são encontrados nos pequenos vasos presentes na derme. Mais superficialmente, na epiderme, a eumelanina (marrom escuro), a feomelanina (amarelo ou vermelho escuro) e, menos freqüentemente, os carotenóides (amarelo) são os pigmentos mais encontrados (PETIT & PIERARD, 2003).

As melaninas são um grupo complexo de biopolímeros pigmentados produzidos em células altamente especializadas chamadas melanócitos, encontrados na lâmina basal de epiderme, nos folículos pilosos e, menos freqüentemente, na derme (Fig. 1) (AHN *et al*., 2002). Melanócitos são células dendríticas que na epiderme, em conjunto com queratinócitos, formam uma unidade funcional denominada "unidade epidermo-melânica" (UEM) e interagem de forma fechada na produção e distribuição de melanina humana durante o processo de pigmentação (AHN *et al*., 2003). Uma típica UEM é composta por 1 melanócito em contato com ~35-40 queratinócitos vizinhos, além de células de Langerhans e fibroblastos que também podem estar presentes (YOON *et al.*, 2003). A quantidade de melanócitos varia em função da área considerada, existindo cerca de 2000/mm2 na pele da cabeça e antebraços e cerca de 1000/mm2 no restante do tegumento. A quantidade de melanócitos não varia em função da raça, levando à conclusão de que diferenças raciais de pigmentação não se devam ao número, mas à capacidade funcional dos melanócitos. Além da

pele, os melanócitos são encontrados no aparelho ocular, na retina, no ouvido, no sistema nervoso central, nas leptomeninges, nas mucosas e nos pêlos (SAMPAIO & RIVITTI, 1998).

Em células humanas, há dois tipos de melaninas, as já citadas eumelanina e feomelanina, com distintas propriedades físicas e biológicas (YOON *et al.*, 2003). A produção dessas substâncias ocorre na membrana de organelas denominadas melanossomos, as quais contêm enzimas específicas responsáveis pelo controle da síntese de pigmentos (PETIT & PIERARD, 2003). No melanócito, a síntese do complexo tirosinase e a formação dos melanossomos se iniciam no retículo endoplasmático rugoso. Ao passar para o complexo de Golgi, a tirosinase é ativada pela presença de cobre formando vesículas citoplasmáticas que se unirão aos melanossomos, formando as estruturas que iniciarão a síntese de melanina. O cobre possui papel relevante como co-fator enzimático da tirosinase e também da dopacromo tautomerase (Fig. 2) que dará origem aos diversos tipos de melanina (ORDIZ, 2003).

Figura 1. Estrutura da pele incluindo a localização dos melanócitos e a produção de melanina.



Fonte: A.D.A.M., 2002.

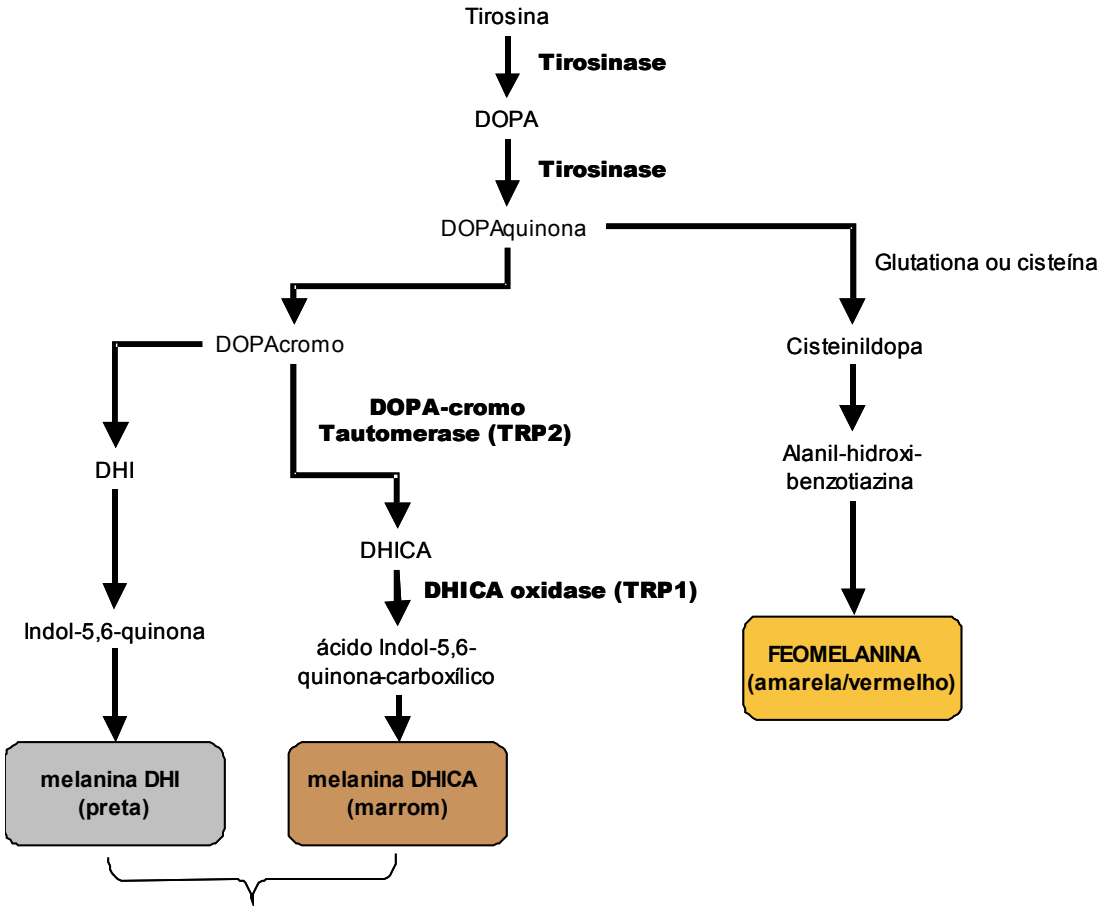
O primeiro, e limitante, passo na formação da melanina é mediado pela tirosinase (AHN *et al*., 2003). A tirosinase catalisa a hidroxilação da tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) e sua subseqüente oxidação em dopaquinona. Por um processo de auto-oxidação e ciclização espontânea, a dopaquinona produz a melanina 5,6-diidroxiindol (DHI). Por outra via enzimática, o intermediário dopacromo, na presença da dopacromo tautomerase (também chamada TRP-2), é convertido a ácido 5,6-diidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), posteriormente oxidado a melanina DHICA pela TRP-1, também conhecida como DHICA oxidase. Em uma outra via, ainda, a dopaquinona, na presença de glutation ou cisteína, pode formar a cisteinildopa, convertida em feomelanina num processo de oxidação, ciclização e polimerização (PETIT & PIERARD, 2003). A cascata melanogênica encontra-se resumida na figura 2.

De acordo com o tipo de melanina sintetizada, eumelanossomos elipsóides ou feomelanossomos esféricos serão formados. Essas organelas maduras, então, migram às extremidades dos dendrítos dos melanócitos de onde são transferidos a queratinócitos circunvizinhos (PETIT & PIERARD, 2003). A presença de receptores de protease ativada (PAR-2), expressos nos queratinócitos, mas não nos melanócitos, são suspeitos de estarem envolvidos nessa transferência (SEIBERG *et al.*,2000). A pigmentação resultante é finalmente diminuída pela degradação da melanina durante a ascensão dos queratinócitos até a região do extrato córneo. A melanina remanescente desse processo é perdida por processo de descamação (PETIT & PIERARD, 2003).

Durante o processo melanogênico, os queratinócitos são responsáveis pela produção de fatores parácrinos que afetam a proliferação de melanócitos, a síntese de melanina e a transferência da melanina a queratinócitos adjacentes (AHN *et al*., 2003). Diversas substâncias endógenas são responsáveis pelo controle biológico do processo de melanogênese, entre elas várias citocinas (IL-1, IL-6, TNF-α), fatores de crescimento (ET-1, bFGF) e mediadores inflamatórios

(leucotrienos, prostaglandinas) (PETIT & PIERARD, 2003). Encontra-se bem estabelecido, porém, que o estímulo mais importante da melanogênese imediata (oxidação da melanina pré-formada) é a luz visível. A radiação ultravioleta (UVA e UVB) constitui o fator estimulante tardio (por neoformação de melanina como conseqüência inflamatória) mais importante da pigmentação da pele humana (AHN *et al*., 2003; ORDIZ, 2003). Cabe ainda salientar que a produção de melanina também está subordinada à porção intermediária da hipófise por meio de seu hormônio: a intermedina ou MSH. Existe ainda uma substância denominada melatonina que produz o clareamento da pele ao induzir a agregação dos grânulos de melanina ao redor do núcleo das células. A melatonina é produzida pela hipófise pela ação da noradrenalina (AZULAY & AZULAY, 1999a; SAMPAIO & RIVITTI, 1998a).

Figura 2. Cascata melanogênica.



FONTE: PETIT & PIERARD, 2003.

A melanina desempenha importante papel na defesa da pele humana, seja pela captura de radicais livres oxidativos ou contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta (UV), por sua propriedade de absorver e refletir essa radiação (SAMPAIO & RIVITTI, 1998a). Há uma significativa inversão entre a pigmentação cutânea e a ocorrência de tumores malignos e lesões por UV. A uniformidade e a cor da pele têm também um importante papel estético, que pode ser

comprometido por doenças envolvendo a pigmentação (VIRADOR *et al.*,1999). Essas doenças, em que a densidade ou distribuição dos melanócitos encontra-se alterada ou há falhas em algum dos passos da cascata melanogênica, são denominadas discromias (PETIT & PIERARD, 2003).

3.2 DISCROMIAS

Discromias são alterações patológicas da coloração da pele que deixam marcas ou máculas mais escuras (hipercromias) ou mais claras (hipocromias). Resultam da diminuição (leucodermias) ou aumento da melanina (melanodermias). Outros pigmentos endógenos (bilirrubina, alcaptona, derivados hemoglobínicos) e exógenos (cloroquina, tetraciclinas, clofazimina, ouro e outros) também podem produzir discromias (AZULAY & AZULAY, 1999b; SAMPAIO & RIVITTI, 1998b).

Doenças ligadas à pigmentação são bastante freqüentes e dependentes tanto de fatores genéticos como ambientais. Entre essas doenças, as produzidas por excesso de melanina são as mais freqüentes e particularmente problemáticas em indivíduos de pele negra (PETIT & PIERARD, 2003).

Segundo AZULAY & AZULAY (1999b), as discromias podem ser classificadas em:

- *Hipocromias ou acromias*: diminuição ou ausência de melanina.
- *Hipercromias*: produzidas por excesso de melanina.
- *Leucomelanodermias*: Produzida pela mistura das duas anteriores.
- *Discromias por outros pigmentos*: Produzida por acúmulo de outros pigmentos que não a melanina.

As hipocromias são representadas por doenças como albinismo, piebaldismo, poliose, nevo acrômico, hipomelanose de Ito, Síndrome de Chediak-

Higashi, Síndrome de Klein-Waardenburg, Síndrome de Cross-McKusick-Breen, Vitiligo, entre outras e não serão descritas em detalhes. Considerando o objeto de estudo deste trabalho (agente despigmentante ácido kójico) serão descritas as hipercromias hereditárias e adquiridas mais comuns. O quadro 1 mostra as hipercromias hereditárias mais importantes.

Quadro 1. Síndromes hipercrômicas hereditárias predominantemente autossômicas dominantes

Denominação	Idade do aparecimento	Distribuição
Efélides (sardas)	3-5 anos	Manchas castanho-claras, pequenas, mais evidentes em áreas expostas ao sol.
Melanismo	Congênita ou 1ª infância	Toda a pele; maior intensidade nas flexuras.
Síndrome de Leopard	Congênita ou 1ª infância	Lentigens múltiplas no tronco e pescoço, porém podem atingir todo o corpo.
Lentiginose (lentigo) centrofacial	1° ano	Centrofacial.
Síndrome de Peutz-Jeghers	0-10 anos	Mucosa oral, peitoral, nariz, pés e mãos.
Síndrome de Fanconi	4-10 anos	Generalizada, com maior freqüência no tronco, flexuras e pescoço.
Síndrome de Franceschetti-Jadasshon	2-3 anos	Pigmentação reticular no tronco e membros.
Discromatose universal	1-3 anos	Máculas mosqueadas, disseminadas; poupa face.
Acropigmentação de Kitamura	1ª infância	Pigmentação mosqueada no dorso das mãos.
Síndrome de Bloch-Sulzberger (incontinência pigmentar)	Primeiras semanas	Pigmentação em respingos ou reticulada; troncos e membros.

FONTE: AZULAY & AZULAY, 1999b (adaptado)

Entre as hipercromias adquiridas mais comuns estão a melanose actínica, o melasma, hipercromias medicamentosas, melanodermias tóxicas, nevus melanocíticos comuns e as fitofotodermatoses.

3.2.2 Melanose Actínica

Caracteriza-se por máculas de até 1,5 cm de diâmetro, de cor variável desde o amarelo até marrom escuro, resultante de uma proliferação dos melanócitos devido à exposição solar crônica. Acomete mais freqüentemente os caucasianos, na faixa etária dos 40 anos, ou antes em regiões de clima mais quente. Localiza-se no dorso das mãos, punhos, antebraço e face. A superfície pode ser rugosa, quando há associação com queratose actínica. Comumente chamada de Lentigo senil ou solar, porém sem ter nenhuma relação etiopatogenética com o lentigo (SAMPAIO & RIVITTI, 1998b).

3.2.3 Melasma

O Melasma, ou Cloasma, é uma hipermelanose adquirida bastante importante, caracterizada por uma pigmentação irregular epidérmica, dérmica ou mista que acomete principalmente a face e, ocasionalmente, o pescoço. Sua etiologia é ainda pouco esclarecida, podendo ser idiopática ou mais comumente associada com gravidez ou uso de anticonceptivos orais (KATSAMBAS & STEFANAKI, 2002). A predisposição genética e a exposição excessiva à luz solar são consideradas fatores de risco maiores, tendo, ainda, os raios UVA e UVB um papel de agravamento do quadro (COTELLESSA *et al*., 1999; SANCHEZ *et al*., 1981). Estudos microscópicos revelam um aumento no número e atividade de melanócitos específicos os quais estão aparentemente envolvidos no aumento da formação, melanização e transferência dos melanossomos para a epiderme e derme (SANCHEZ *et al*., 1981).

Clinicamente caracteriza-se pelo surgimento de manchas escuras irregulares de cor próxima ao marrom ou cinza, distribuídas na região malar, mandibular ou, mais freqüentemente, na região centro-facial. Não há um tratamento universalmente efetivo para o melasma, porém vários agentes

despigmentantes podem ser utilizados, objetivando a regularização da pigmentação e a correção estética (HERMANNS *et al*., 2002; AZULAY & AZULAY, 1999b).

3.2.4 Hipercromias Medicamentosas

Podem ser causadas por uma série de fármacos incluindo clofazimina, clorpromazina, citostáticos, arsênico, prata, ouro, hidantoína, contraceptivos orais, entre outros. A hipercromia residual se deve a processos inflamatórios, que ao final, deixam manchas hipercrômicas. São mais intensas e duradouras em pessoas de pele mais escura e tendem a desaparecer espontaneamente (AZULAY & AZULAY, 1999b).

3.2.5 Melanodermias Tóxicas

Ocorrem por fototoxicidade por raios UVA induzida pela utilização de perfumes, colônias, loções pós-barba ou lenços refrescantes que contenham derivados de petróleo. O quadro clínico inicial é de eritema com descamação, surgindo posteriormente a hipercromia reticulada. Com a retirada do agente contatante há melhora do quadro, entretanto dependendo da quantidade de melanina que extravasou para a derme (incontinência pigmentar) pode ocorrer pigmentação permanente (SAMPAIO & RIVITTI, 1998b).

3.2.6 Nevos Melanocíticos Comuns

São lesões planas ou elevadas, cuja coloração varia da cor da pele ao negro, constituídas por células névicas. Conhecidos como “pintas”, são benignas e de origem adquirida (quando congênitas são chamadas Nevos Melanocíticos congênitos). Podem ser planas ou elevadas, lisas ou verrugosas e pigmentadas ou de cor mais clara. O maior risco deste tipo de lesão é sua capacidade de

transformação em melanoma maligno, requerendo, por isso, avaliação médica, principalmente quando localizados na região palmo-plantar, dedos, genitália e mucosas e de característica plana ou ligeiramente elevada (SAMPAIO & RIVITTI, 1998b).

3.2.7 Fitofotodermatoses

Ocorrem após contato com furocumarinas (presentes em algumas plantas e frutos) e exposição solar. Em nosso meio, é freqüentemente produzida pelo contato com limão “Taiti”, uma variedade que contém a substância fotossensibilizante. Surgem inicialmente manchas eritematosas com disposição irregular e, posteriormente, a melanodermia que irá gradualmente desaparecer em algumas semanas, mesmo sem tratamento (AZULAY & AZULAY, 1999b; SAMPAIO & RIVITTI, 1998b).

3.3 AGENTES DESPIGMENTANTES

Agentes despigmentantes ou hipopigmentantes são substâncias capazes de alterar a pigmentação da pele. Os agentes hipopigmentantes correntemente usados atuam sobre os melanócitos, nas diversas etapas da melanogênese e/ou na transferência da melanina para os queratinócitos. São eficazes em vários distúrbios funcionais dos melanócitos, entre eles o melasma, porém menos em problemas ligados à hiperplasia melanocítica, como as lentiginoses (HERMANNS et al.,2002). (Estes agentes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, considerando que alguns fármacos podem agir simultaneamente em várias etapas do processo melanogênico (PETIT & PIERARD, 2003).

Vários agentes despigmentantes estão disponíveis para comercialização, contendo um ou mais fármacos em associação. Estas formulações podem ser de

medicamentos de prescrição, não-prescritos (venda livre) ou cosméticos. Os quesitos para registro desses produtos podem variar consideravelmente de um país para o outro, resultando em diferenças de eficácia e segurança de acordo com a região do mundo (PETIT & PIERARD, 2003). O uso de associações desses agentes é muito comum, provendo melhora no perfil de eficácia e tolerabilidade por meio de mecanismos de ação complementares ou sinérgicos entre os fármacos (PETIT & PIERARD, 2003).

Vários são os agentes atualmente disponíveis com ação despigmentante. Alguns deles (extrato de uva ursi, extrato aquoso de leucócito, arbutin, antipollon HT, extrato de bétula e amora, mercaptominas e cloreto de beta-caroteno-etilamina) são usados com menor freqüência e por isso não serão tratados em profundidade. Entre os agentes mais usados estão a hidroquinona, tretinoína (ácido retinóico), corticosteróides, ácido azeláico, ácido fítico, ácido ascórbico, ácido glicólico, α- e β-hidroxiácidos e o ácido kójico.

3.3.1 Hidroquinona

A hidroquinona é um dos agentes despigmentantes mais comumente utilizados e historicamente o primeiro a demonstrar sua atividade (ORDIZ, 2003). Acredita-se que seu mecanismo de ação esteja ligado à inibição da tirosinase, considerando sua estrutura análoga aos precursores da melanina, à inibição da síntese de RNA ou DNA, à degradação dos melanossomos e destruição de melanócitos. Sua eficácia clínica depende da concentração do fármaco, da natureza do veículo e da estabilidade da formulação. É normalmente utilizado em concentrações de 1,5 a 5% (PETIT & PIERARD, 2003).

Concentrações acima de 5% não são recomendadas devido ao maior risco de surgimento de reações adversas. A hidroquinona é altamente reativa e um potente composto mutagênico e citotóxico para o melanócito, pelo que sua

utilização em produtos cosméticos é atualmente não autorizada nos Estados Unidos (PETIT & PIERARD, 2003).

3.3.2 Tretinoína

A tretinoína (ácido retinóico) é considerada por si mesma um fraco agente despigmentante, agindo sobre os melanossomos nos queratinócitos e acelerando a taxa de renovação da epiderme. Seu principal efeito adverso é a irritação gerada no local da aplicação (PETIT & PIERARD, 2003). Seu conhecido efeito teratogênico deve também ser considerado durante a prescrição. É usado comumente em associação, obtendo bons resultados especialmente com a hidroquinona (PETIT & PIERARD, 2003).

3.3.3 Corticosteróides

O efeito clareador dos corticosteróides por via tópica é extensamente conhecido há vários anos, porém seu mecanismo de ação permanece inexplicado (PETIT & PIERARD, 2003). Hidrocortisona, dexametasona, betametasona, fluocinolona e triancinolona são os fármacos mais comumente utilizados em associação com outros agentes clareadores a fim de aumentar sua eficácia terapêutica e diminuir os efeitos irritativos. Tratamentos em longo prazo não são recomendados devido ao surgimento de numerosos efeitos adversos próprios dos corticosteróides (PETIT & PIERARD, 2003).

3.3.4 Ácido Azeláico

O ácido azelaico é um ácido dicarboxílico isolado da *Malassezia* spp. com atividade inibitória *in vitro* sobre diversas oxi-redutases mitocôndrias. Inibe, além disso, a tirosinase, a síntese de DNA e atua sobre espécies de oxigênio reativo (PETIT & PIERARD, 2003). Pode ser usado como agente clareador tanto de forma

isolada como em associações, como por exemplo, com o ácido glicólico (KAKITA & LOWE, 1998).

3.3.5 Ácido Fítico

O ácido fítico é usado em concentrações de 1-2% e atua como quelante de íons cobre e ferro. Apresenta como vantagem um baixo potencial irritativo, podendo ser usado em regiões sensíveis da pele, como pálpebras (ORDIZ, 2003).

3.3.6 Ácido Ascórbico

A vitamina C (ácido ascórbico) é conhecida como agente inibidor da formação da melanina pela redução na formação da *o*-quinona e da melanina oxidada. Trata-se de uma substância antioxidante que age sinergicamente com a Vitamina E em uma série de passos oxidativos da síntese de melanina sendo, porém, muito instável e rapidamente oxidada em solução aquosa (PETIT & PIERARD, 2003). A síntese de um derivado denominado fosfato de ascorbil magnésio, conhecido pela sigla VC-PMG, foi realizada a fim de resolver esse problema, apresentado, porém, problemas posteriores de perfusão cutânea (PETIT & PIERARD, 2003).

3.3.7 α- e β-Hidroxiácidos

α-hidroxiácidos e β-hidroxiácidos são comumente utilizados em altas concentrações como agentes clareadores e em *peelings* químicos. Exemplos dessas substâncias são o ácido glicólico (mais usado) e o ácido salicílico. São utilizados também em associação com hidroquinona e ácido kójico (PETIT & PIERARD, 2003).

3.3.8 Ácido Kójico

O ácido kójico (AK) (Fig. 3) é uma substância natural produzida por uma enorme variedade de microorganismos, principalmente fungos do gênero *Aspergillus*, (BURDOCK, SONI & CARABIN, 2001) que possui fraca ação antimicrobiana contra uma séria de cepas bacterianas comuns, sendo ativo em diluições de 1:1000 a 1:2000 (NOHYNEK *et al.*, 2004).

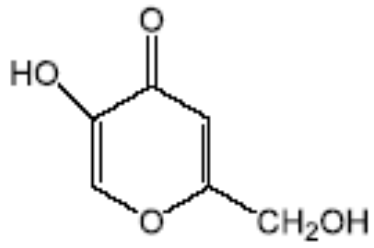


Figura 3. Estrutura do ácido kójico

O AK foi descrito pela primeira vez em 1907, quando SAITO (1907) relatou a descoberta de um novo ácido orgânico produzido pelo *Aspergillus oryzae*. Desde então, vários autores descreveram a produção do AK em uma série de organismos em diferentes substratos (Tab. 1) e sob condições de laboratório (BURDOCK, SONI & CARABIN, 2001). Outros autores, ainda, avaliaram a influência de diversos substratos sobre o crescimento fúngico e a produção de AK (ROSFARIZAN, MADIHAH & ARIFF,1998).

O AK [5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona ou 2-hidroximetil-t5-hidroxi-γ-pirona] possui fórmula molecular $C_6H_6O_4$, peso molecular 142,11 e apresenta-se como pó amarelo quase inodoro, facilmente solúvel em água, etanol e acetona e fracamente solúvel em éter e clorofórmio. Tem pKa de 7.90 e 8.03 e ponto de fusão entre 153-154°C (BUDAVARI, 1996).

Pode ser obtido após término do processo fermentativo por um dos seguintes métodos: 1) precipitação como sal cóbrico, 2) extração com etil-acetato, 3) extração contínua com éter, 4) evaporação até um pequeno volume principal para cristalização a 0°C, 5) extração com clorofórmio ou 6) absorção com carbono ativado seguida de eluição com butil-acetato saturado com amônia desidratada (BAJPAI, AGRAWAL & VISHWANATHAN,1982).

Tabela 1. Relatos de ocorrências de ácido kójico

Fonte Natural	Concentração	Organismo De Origem
Milho (Região de Zurich)		
Milho (Sul da África)		
Farelo de trigo, feijão-soja moído.		*Aspergillus flavus* *Aspergillus*
Arroz	37,6-40,5 ppm	*A. flavus*
Ração animal		*A. oryzae*
Ração animal		*A. nidulans*
Ração animal		*A. fumigatus*
Ração animal		
Cereais	40 mg/ml (em média)	*A. oryzae*
Comidas fermentadas japonesas		*A. tamari, A. flavus* *A. flavus*
Comidas fermentadas japonesas		*A. fumigatus Fres.* *Penicillium*
Cereais		
Queijo azul dinamarquês		*Aspergillus*
Abóbora (não processada;não refrigerada)		*Aspergillus spp. (14 isolados)* *Penicillium spp. (6 isolados)*
Condimentos		
Pele humana	57-59 mg/ml	*A. fumigatus*
	0,133-3,4 mg/ml	*A. candidus ATCC44054*
Pneumonia em Búfalos	22 mg/ml	*A. flavus*
Extrato de leveduras	60 mg/ml	*A. flavus ATCC9179*
Extrato de leveduras		*Imobilização com*
Suco ou extrato de cacau	23,5 mg/ml	*Calcio alginato*
Goma de sagu		*A. flavus*

FONTE: BURDOCK, SONI & CARABIN, 2001(adaptado)

O mecanismo de produção do AK durante a fermentação não está ainda totalmente elucidado. Acredita-se que sua síntese nas diferentes espécies de A*spergillus* se dê por processo de biotransformação da glicose em várias etapas (BAJPAI, AGRAWAL & VISHWANATHAN,1982; KITADA & FUKIMBARA, 1971). Outros mecanismos propostos envolvem a condensação da diidroxiacetona (ou derivado) (ARNSTEIN & BENTLEY, 1953) e a incorporação de pequenas moléculas como acetato, glicina e piruvato (BURDOCK, SONI & CARABIN, 2001).

O AK tem sido comercializado por muitos anos no Japão (produzido principalmente pelo *A. oryzae*) como aditivo alimentar (antioxidante) para vegetais e frutos do mar, com objetivo de preservá-los frescos e evitar descoloração. É encontrado também em baixos níveis (0.2 a 1.0 ppm) em comidas tradicionais japonesas como molho de soja ou sakê, o que leva a uma elevada exposição diária da população japonesa ao AK (NOHYNEK *et al.*, 2004). Além disso, é utilizado para prevenir alterações no sabor em carnes “requentadas”, para inibir a formação de nitrosopirrolidina no bacon frito e produzir avermelhamento em morangos verdes antes da colheita (BURDOCK, SONI & CARABIN, 2001). Aspectos da segurança do uso do AK em alimentos recentemente revisados por BURDOCK, SONI & CARABIN (2001), mostraram ser a substância inofensiva para a saúde humana na quantidade consumida como aditivo alimentar.

Do ponto de vista terapêutico, o AK tem sido amplamente utilizado em preparações dermocosméticas como agente clareador, devido a sua atividade inibitória da formação da melanina e por sua ação protetora contra raios ultravioleta. Sua presença em cosméticos, ainda, prolonga a vida útil desses produtos na medida em que retarda sua degradação tanto química como microbiana (UTHER *et al.*, 1993). O AK é um inibidor seletivo da tirosinase, que desempenha papel chave na cascata melanogênica (figura 2), sendo essa ação claramente observada em trabalhos publicados (VIRADOR *et al.*, 1999;

CABANES, CHAZARRA & CARMONA, 1994). Possui, ainda, ação antioxidante contra espécies reativas do oxigênio (radicais livres), como por exemplo, o °OH, $^{\circ}O_2^-$ e $^1O_2$ (GOMES *et al.*,2001) e apresenta impacto significante sobre a fisiologia queratinocítica normal, com supressão de síntese de citocinas e sua secreção (AHN *et al*., 2003).

A eficácia do AK como agente despigmentante foi demonstrada em concentrações de 1 a 5 % isolado na forma de creme ou, principalmente, em associação. Autores relatam também uso na concentração de 2 a 4%, associado a tretinoína ou corticosteróides (KATSAMBAS; STEFANAKI, 2002). No Brasil seu uso é predominantemente por formulação magistral, por não existirem apresentações comerciais industrializadas, ao contrário de outros países. O modo de utilização é por via tópica, massageando á área afetada duas vezes ao dia por um período de 1 a 2 meses, durante o qual pode ocorrer esfoliação da pele. O resultado esperado para o tratamento pode ser medido pelo alcance da coloração desejada na pele. É recomendado o uso de filtros UVA e UVB durante todo o tratamento (ELLIS, 1997).

Em ensaio clínico não controlado, duplo-cego, com 12 semanas de duração, envolvendo 21 pacientes do sexo feminino com melasma, a associação de ácido kójico 3% com ácido glicólico 5% mostrou eficácia na redução da pigmentação similar ao ácido glicólico 5% isolado. O índice de melanina, porém, apresentou-se reduzido somente pelo uso do creme contendo ácido kójico (HUIPRASERT, 2001). Estudo avaliando a eficácia do *peeling* químico para o tratamento do melasma difuso em 20 pacientes demonstrou eficácia da solução contendo ácido kójico 10% associado a ácido glicólico 50%. A regressão completa do melasma foi observada em 30% dos pacientes, regressão parcial em 60% e nenhuma regressão em 10%. O estudo não demonstrou, porém, superioridade da associação ácido kójico/ ácido glicólico sobre o uso de ácido glicólico isolado (COTELESSA *et al*.,1999). O uso associado com hidroquinona mostrou-se mais

eficaz *in vitro* do que o agente isolado. Além disso, essa associação permitiu a utilização de menores concentrações dos fármacos, com menor potencial irritativo para a pele (FERIOLI *et al*., 2001). Em outro estudo clínico com duração de 12 semanas, a adição de AK 2% a gel contendo 2% de hidroquinona e 10% de ácido glicólico demonstrou resultados clínicos no tratamento do melasma superiores a mesma formulação sem AK (LIM, 1999).

A segurança (toxicidade e genotoxicidade) do AK por via tópica foi revisada por NOHYNEK *et al.* (2004), que concluíram que esta via de utilização não oferece riscos para o consumidor sob estes aspectos. Outros autores, no entanto, (NAKAGAWA, KAWAI & KAWAI, 1995) relataram casos de dermatite de contato causada pelo AK, sugerindo alto potencial sensibilizante para esse fármaco.

3.3.8.1 Métodos de quantificação do ácido kójico

Não se encontra atualmente relatado em monografias oficiais[1] um método padrão para quantificação do ácido kójico em creme. No Brasil, diferentemente de outros países, a não existência de um produto padrão industrializado no mercado contribui para isso.

Considerando, no entanto, a boa absorção na região do ultravioleta por essa substância, o uso de técnicas espectrofotométricas surge como uma solução relativamente simples a essa lacuna, além de técnicas mais avançadas cromatográficas.

Recentemente, foi publicado um trabalho em que se desenvolveu e validou um método para quantificação do ácido kójico em matérias primas e formulações por espectrofotometria ultravioleta. Neste trabalho, utilizaram-se soluções padrão

[1] Farmacopéias Americana, Britânica, Portuguesa e Brasileira. Fonte: O Autor.

de ácido kójico e se avaliaram parâmetros de sensibilidade, robustez, exatidão, precisão e especificidade do método. Os resultados mostraram que o método apresenta linearidade entre 5 e 25 µg/ml, boa sensibilidade, robustez com relação a variações de tempo de leitura e temperatura (mas não com variações de pH acima de 7), exatidão e precisão. No entanto, a presença de outra substância que absorva no mesmo comprimento de onda que o ácido kójico (como é o caso do metilparabeno) compromete a especificidade do método (GOMARA et al., 2004).

A partir dessa limitação da espectrometria convencional, a mesma autora desenvolveu outro método em que se utilizava a complexação do ácido kójico ao cloreto férrico, que desloca o comprimento de onda de máxima absorção para a região visível do espectro, como artifício para eliminar possíveis interferentes. O resultado é um método também validado para esse fim sob parâmetros de precisão, exatidão, robustez e linearidade, com maior especificidade se comparado ao convencional, porém com menor sensibilidade (GOMARA, 2003).

Fora da área farmacêutica, diferentes métodos de quantificação do AK em produtos de fermentação ou alimentos têm sido propostos ao longo dos últimos 20 anos. Para esse fim diversos métodos já foram desenvolvidos e publicados, entre eles a espectrofotometria (TANIGAKI, OBATA & TOKUYAMA,1980), a cromatografia em camada delgada (DURAKOVA, BETINA & NEMEC, 1976), a cromatografia gasosa (OWENS, WELTY & LUCAS, 1970) e a Cromatografia Líquida de alta eficiência (FRISVAD & THRANE, 1987). Esses métodos são revisados em maiores detalhes em trabalho publicado por BURDOCK, SONI & CARABIN (2001) sobre a segurança do uso do ácido kójico em alimentos.

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O conceito de validação em metodologia analítica intensificou-se na década de 70, nos Estados Unidos, acompanhando a preocupação com a qualidade dos produtos, na medida em que a indústria farmacêutica assumia proporções importantes de mercado e os medicamentos se firmavam como principal estratégia terapêutica no restabelecimento da saúde.

O objetivo principal da validação é garantir que os resultados de uma análise sejam confiáveis. Isso se dá por meio de análises experimentais do método em um ambiente onde os equipamentos e materiais estejam devidamente calibrados e os analistas sejam adequadamente qualificados. Não é possível estabelecer, no entanto, um sistema universal de validação. Isso devido à grande variedade de substâncias, métodos e suas complexidades. Assim, torna-se importante um bom planejamento em que sejam avaliados os requerimentos legais e o método analítico escolhido (CHASIN *et al.*, 1998).

Considerando a grande variedade de métodos analíticos, estes podem ser classificados segundo sua finalidade (USP, 1999):

- **Categoria I:** Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas;
- **Categoria II:** Teste quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas;
- **Categoria III:** Testes de performance (Ex: dissolução, liberação do ativo);
- **Categoria IV:** Testes de identificação.

De modo geral, um método deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade e exatidão adequados à análise, porém, para cada categoria é exigido um determinado conjunto de testes, relacionados na tabela 2 (ANVISA, 2003).

Tabela 2. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

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

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico;
** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

FONTE: ANVISA, 2003.

Uma vez validada, uma metodologia deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias: a) mudanças na síntese da substância ativa, b) mudanças na composição do produto acabado e c) mudanças no procedimento analítico (ANVISA, 2003).

3.4.1 Especificidade

Entende-se por especificidade 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 (ANVISA, 2003). Isso corresponde à capacidade de um método de não apresentar resultados falso-positivos, quando da identificação de uma substância, por exemplo.

Os procedimentos para demonstrar a especificidade dependerão do objetivo do procedimento analítico, porém esse deve ser o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método (LEITE, 2002).

Para análises quantitativas (teor) e análises de impurezas, este parâmetro pode ser avaliado pela incorporação à matéria-prima ou produto acabado sob exame de níveis apropriados de impureza ou excipientes, demonstrando-se que o resultado não é afetado pela presença destes compostos. Outra maneira é comparar os resultados do teste com os de um segundo método validado e bem caracterizado (ANVISA, 2003).

3.4.2 Intervalo

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 (ANVISA, 2003). A idéia é que o método deve apresentar linearidade, exatidão e precisão quando as quantidades do analito encontrem-se dentro de um determinado intervalo. Dependendo do tipo de ensaio, diferentes intervalos podem ser especificados (ANVISA, 2003; ICH, 1996):

- Para a determinação quantitativa de matéria-prima ou produtos acabados: normalmente de 80% a 120% da concentração teórica do teste;
- Para determinação de impurezas: do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado;
- Para ensaio de uniformidade de conteúdo: de 70% a 130% da concentração teórica do teste;
- Para ensaios de dissolução: ± 20% sobre o valor especificado no intervalo.

3.4.3 Linearidade

A linearidade corresponde à 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 (ANVISA, 2003).

A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual de gráfico plotado pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, conforme intervalo especificado pelo tipo de ensaio. Se houver relação linear aparente, os resultados devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como a regressão linear pelo método de mínimos quadrados. As grandezas observadas podem ser o coeficiente de correlação, coeficiente de determinação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular (ver sensibilidade) e desvio padrão relativo (ANVISA, 2003; ICH, 1996). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual a 0,99 (ANVISA, 2003).

3.4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias de avaliação da exatidão estão disponíveis (ANVISA, 2003; ICH, 1996):

- Matérias-primas (fármacos). Pela aplicação da metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de um segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

- Produtos acabados (forma farmacêutica). Pela análise de uma amostra em que quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na indisponibilidade de todos os componentes do medicamento, a análise pelo método de adição de padrão, em que se adiciona quantidade conhecida do analito (padrão de referência) ao medicamento.

A exatidão é calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica (real)}} \times 100$$

A exatidão deve ser determinada 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 (ANVISA, 2003).

3.4.5 Precisão

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). A precisão pode ser considerada em três níveis (ANVISA, 2003; ICH, 1996):

- Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e instrumentação. Esta pode ser obtida pela avaliação de um mínimo de 9 (nove) determinações de um mínimo de 3 (três) níveis de concentrações, de acordo com o intervalo especificado (ex. 3 concentrações/3 replicatas cada) ou num mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste.

- Precisão Intermediária (Precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

- Reprodutibilidade (Precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, não devendo ultrapassar 5% de variação. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) é obtido segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} x100$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada (ANVISA, 2003).

3.4.6 Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método em resistir e pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante

o uso normal (ANVISA, 2003). Constatando-se a suscetibilidade do método a variações nos resultados de acordo com essas variações, estas deverão ser declaradas como precauções e controladas durante a execução do procedimento. A tabela 3 traz os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez de um método.

Tabela 3. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico

Preparo das amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Temperatura
	Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste

FONTE: ANVISA, 2003.

3.4.7 Sensibilidade

A sensibilidade é definida como a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de segurança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é útil como um parâmetro comparativo entre dois métodos, em que o método de maior sensibilidade apresenta curva padrão com maior inclinação (ICH, 1995).

3.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

De modo geral, as concentrações dos compostos de interesse numa amostra podem ser determinadas pela construção de curvas de calibração em

cada comprimento de onda a partir de soluções padrão de cada analito a fim de se estabelecer constantes de proporcionalidade individuais entre concentração e intensidade de absorção. No caso de misturas binárias simples, obtém-se bons resultados por este método, porém quando se passa para amostras reais, podem surgir problemas devido a interferências espectrais e desconhecimento da real identidade dos compostos de interesse. Nestas situações, a resolução simultânea das equações já não fornece resultados precisos e por isso foram buscados novos métodos para resolver este tipo de problema (FERREIRA *et al*., 1999).

Nos anos 70 nasceu a já descrita quimiometria, disciplina que agrupa métodos de análise estatística, modelamento matemático e inteligência artificial, com objetivo de projetar e selecionar procedimentos e experimentos de forma otimizada para a aquisição de dados químicos, obtendo o máximo de informação por meio da análise destes dados (MASSART et al.,1988). Apesar de sua proximidade com modelos estatísticos, a quimiometria é defendida como uma disciplina não da matemática, mas da química, isto é, os problemas que ela se propõe a resolver são de interesse e originados na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente da matemática, estatística e computação (FERREIRA et al., 1999).

A calibração multivariada é parte da quimiometria e surgiu acompanhada dos avanços em *software* e *hardware*, permitindo, hoje, um interfaceamento bastante sofisticado entre instrumentos analíticos e computadores e a produção e análise de enormes quantidades de informação, impensáveis por métodos convencionais (FERREIRA et al., 1999).

Um exemplo notável de sua aplicação é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é rotineiramente registrada em um único espectro, e que pode ser analisada simultânea e seqüencialmente em uma única amostra (FERREIRA *et al.,* 1999; THOMAS, 1994). A calibração multivariada é

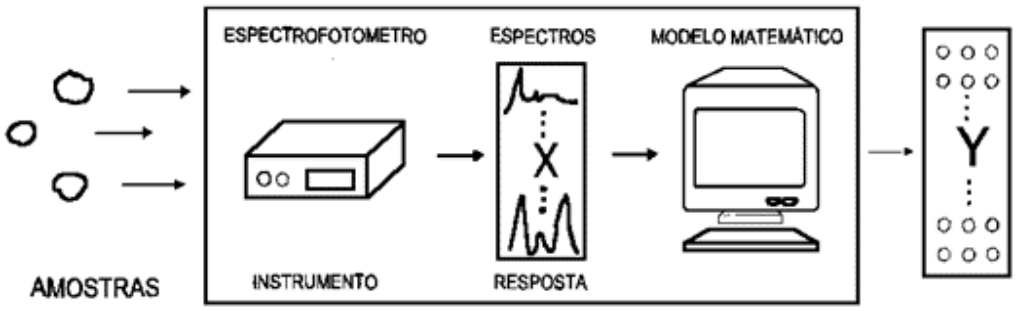
empregada de forma bastante efetiva justamente nos casos em que existe o problema de superposição de sinais analíticos e para determinações simultâneas. Um modelo de calibração é produzido com base em todas as informações disponíveis, a fim de estabelecer relação entre todo o sinal analítico e a propriedade de interesse (por exemplo, concentração) (COSCIONE, 2001).

A aquisição de um grande volume de dados, no entanto, mesmo que o experimento tenha sido planejado, não significa necessariamente que estes contenham a informação necessária para descrever a propriedade de interesse nas amostras. Assim, o planejamento dos experimentos e a seleção das variáveis também são alvo de estudo da quimiometria e devem ser considerados quando se pretende utilizar métodos mais sofisticados para obter informações acerca dos dados coletados (BEEBE & KOWALSKI, 1987).

3.5.1 Princípios

Tendo como objetivo a determinação da concentração de um determinado analito em uma amostra, um instrumento de laboratório não produz diretamente as concentrações das amostras. Por exemplo, um espectrofotômetro registrará a absorvância, que naturalmente dependerá da concentração do analito (FERREIRA *et al.*, 1999). A calibração corresponde ao procedimento realizado a fim de identificar um algoritmo matemático que produza a propriedade de interesse a partir dos resultados registrados pelo instrumento. Neste processo, a análise realizada pelo computador de um conjunto de dados gerados pelo instrumento (por exemplo, absorvância), permitirá a criação de um chamado “modelo de calibração”. Este modelo, uma vez identificado, poderá prever a concentração do analito em amostras de composição desconhecida (FERREIRA et al., 1999). O resultado de uma calibração encontra-se representado na Figura 4.

Figura 4. Modelo Geral do Processo de Calibração Multivariada



FONTE: FERREIRA *et al*., 1999.

A calibração multivariada consiste, assim, em tentar estabelecer uma relação entre os dois blocos de informação química disponível, o das medidas instrumentais (ex. espectros) e o da propriedade calibrada (ex. concentração) (BEEBE & KOWALSKI, 1987). Esta análise de relação se dá entre um conjunto de dados conhecidos como variáveis independentes, como são os espectros, e uma variável dependente, como a concentração do analito.

Para ilustrar os aspectos básicos da construção de um modelo de calibração, pode-se tomar como exemplo a análise de uma determinada amostra, contendo um único analito de interesse, por espectrofotometria. A análise a fim de se construir um modelo de calibração multivariada inicia-se com a leitura da absorvância em uma determinada região do UV-VIS, envolvendo um número n de comprimentos de onda para amostras padrão (de concentração conhecida) tantos quanto forem determinadas no planejamento experimental, de modo a se construir uma matriz de dados (Fig. 5). Nesta matriz, denominada **X**, cada coluna

corresponde a um comprimento de onda específico do espectro analisado e cada linha corresponde a uma amostra diferente analisada, de concentração conhecida. No interior da matriz, considerando o exemplo, $\mathbf{x_n}$ corresponde ao respectivo valor de absorvância.

Figura 5. Matriz **X** utilizada na construção do modelo de calibração (linha x coluna).

$$\mathbf{X}=\begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

FONTE: FERREIRA *et al*., 1999.

Em outra matriz, denominada Y, serão inseridos os dados referentes às concentrações do analito de interesse (aqui também representadas por x_n) correspondentes a essas soluções, de modo que cada linha desta nova matriz corresponda a uma amostra diferente e a coluna corresponda à concentração do analito presente na amostra (Fig. 6).

Figura 6. Matriz **Y** utilizada na construção do modelo de calibração (linha x coluna).

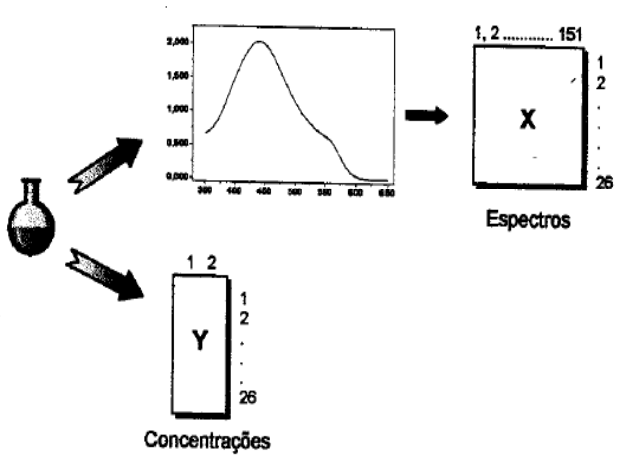
$$\mathbf{Y}=\begin{bmatrix} x_{11} \\ x_{21} \\ \vdots \\ x_{n1} \end{bmatrix}$$

FONTE: FERREIRA *et al*., 1999.

Estes dois blocos de informação, digitalizados e agrupados na forma de matrizes, constituirão o conjunto de calibração e serão analisados para construir o modelo utilizando o método de calibração selecionado (Fig. 7). Antes disso, porém, pode ser necessário algum tipo de manipulação dos dados do conjunto de calibração a fim de otimizar o modelo e ser criado. O chamado pré-processamento muitas vezes é necessário seja na matriz de medidas instrumentais ou nos valores de referência e consiste basicamente em centrar na média ou autoescalar os dados. No primeiro caso, calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai-se cada intensidade do respectivo valor médio. Autoescalar significa centrar os dados na média e dividí-los pelo respectivo desvio padrão, sendo um para cada comprimento de onda (FERREIRA *et al.*, 1999). Quando operações de pré-processamento dos dados forem utilizadas durante a calibração, elas também deverão ser utilizadas sempre que forem feitas previsões

Diversos métodos de calibração multivariada encontram-se atualmente disponíveis. Cada um deles apresenta especificidades que os fazem mais ou menos adequados de acordo com o tipo de análise requerida. De modo geral, o planejamento da calibração deve buscar o método que melhor se adapte ao sistema estudado.

Figura 7. Matrizes de espectros e concentrações que constituem o conjunto de calibração.



FONTE: COSCIONE, 2001.

3.5.2 Métodos de Calibração

Os métodos de calibração multivariada consistem em diferentes técnicas estatísticas utilizadas na análise dos dados experimentais a fim de se determinar propriedades de interesse nas amostras. A aplicabilidade de cada método depende da informação experimental disponível e do objetivo da análise. Problemas envolvendo sistemas multicomponentes em química analítica podem ser classificados em três categorias: sistemas brancos, para os quais existe informação espectral disponível sobre todas as espécies presentes; sistemas cinzas, para os quais a informação espectral disponível é parcial; e sistemas pretos, para os quais não há qualquer informação disponível *a priori* sobre as espécies puras (SENA *et al*., 2001).

SCARMINIO et al. (1998), em uma análise semelhante, classifica os métodos multivariados em três categorias:

I. Quando se dispõe da informação espectral de todas as espécies contidas na amostra;
II. Quando a informação dos espectros das espécies químicas é incompleta ou parcial;
III. Quando não existe nenhuma informação sobre a composição química das amostras.

Na segunda categoria o método mais utilizado é o “generalized rank annihilation factor analysis” (GRAFA), enquanto na terceira categoria, os métodos mais usados são o método para análise de espectros correlacionados (DATAN), “self-modeling curve resolution” (SMCR), “envolving factor analysis” (EFA), “interative self-modeling multivariate analysis” (SIMPLISMA) e “self-modeling multivariate analysis” (ISMA).

Na primeira categoria, os métodos de calibração multivariada podem ser agrupados em quatro sub-categorias:

a) Métodos de calibração direta: regressão linear múltipla (RLM) e “Kalman Filtering” (KF);
b) Métodos de calibração indireta: Método de matriz *k*, método da matriz *p*, regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão em componentes principais (PCR);
c) Métodos de adição de padrão generalizada (GSAM), “interative target testing factor analysis technique” (ITTFA);
d) Métodos de referência interna generalizada (GIRM).

Os métodos de calibração multivariada utilizados com maior freqüência são a regressão linear múltipla (RLM), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão em componentes principais (PCR), dadas sua relativa simplicidade e aplicabilidade em diversos tipos de análises e amostras complexas (SOUZA & PERALTA-ZAMORA , 2001; SCARMINIO et al.,1998).

3.5.2.1 Regressão Linear Múltipla (RLM)

A RLM é o método mais simples de calibração multivariada e é um bom método para sistemas pouco complexos (respostas lineares, sem interferentes, sem interações entre analitos, com baixo ruído e nenhuma colinearidade). Sua limitação está no fato de utilizar toda a informação contida na matriz X, independentemente de sua relevância para o analito de interesse. Isso faz com o modelo incorpore essa informação e perca em capacidade preditiva, além de se tornar muito pouco robusto.

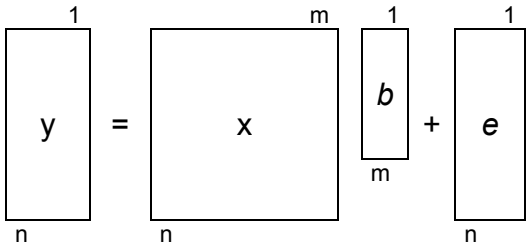
Neste método, a variável a ser prevista (Y) para uma amostra é estimada pela combinação linear das variáveis independentes contida na matriz X. Por

exemplo, como primeira variável, em uma matriz X podem estar contidos várias medidas de absorvância (m), que compõem um espectro de ultravioleta, e como segunda variável (y) a concentração de uma determinado analito em algumas amostras. Esta relação matemática pode ser expressa como (LIMA, 2000):

$$y = x_1b_1 + x_2b_2 + x_3b_3 + x_4b_4 + ... + x_mb_m + e$$

Nesta equação, os x_i são as variáveis independentes, *y* é a variável dependente, os b_i são os coeficientes de regressão e *e* é o erro residual.

Graficamente, esta equação pode ser representada por (LIMA, 2000):



O objetivo na construção do modelo, portanto, é determinar o vetor *b* que apresente melhor capacidade de previsão. Disso advém algumas possibilidades de soluções para b, de acordo com o número de linhas (amostras) e colunas (comprimentos de onda) na matriz X. Justamente essa característica determina a principal limitação deste método. Nos casos em que existam mais colunas do que linhas (menos amostras que variáveis), haverá um número infinito de soluções para b e a inversão da matriz X não será possível, impedindo a construção do modelo. Portanto, para este método deve haver mais amostras do que variáveis ou número de amostras igual ao número de variáveis.

3.5.2.2 Regressão em Componentes Principais (PCR)

A PCR, do inglês “principal components regression”, é um método que possibilita superar as limitações do RLM. A análise de regressão, neste caso, não é feita com base nos valores originais das variáveis da matriz x, mas com base nos scores obtidos em uma análise de componentes principais (PCA). O que se processa é a decomposição da matriz x, produzindo uma matriz de scores **T**, utilizada na determinação dos coeficientes de regressão (b). A equação utilizada na determinação dos valores de y pode ser representada por:

$$Y = T\mathit{b} + E$$

Em que E corresponde ao erro residual. Os coeficientes de regressão obtidos da matriz X serão considerados na previsão de novas amostras. A matriz y permanece sem uma análise PCA.

3.5.2.3 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

A técnica de regressão por mínimos quadrados parciais foi desenvolvida na década de 70 por Herman Wold (1978) e utilizada, inicialmente, na região próxima do infravermelho.

O método PLS (do inglês *partial least squares*) difere do PCR principalmente por considerar a informação contida tanto na matriz X quanto Y, decompondo ambas em seus componentes principais, aqui chamados de variáveis latentes.

Em sua base matemática, o método consiste na decomposição de uma matriz de dados X, em termos da soma de suas várias matrizes M, que apresentem dimensionalidade um, e que são acrescidas de um matriz de resíduos (correspondente à parte não modelada de X), conforme a equação (KONZEN et al., 2003):

$$X = M_1 + M_2 + ... + M_a + E$$

Onde *a* corresponde ao número de variáveis latentes (componentes principais ou fatores) selecionados para truncar a igualdade, e E corresponde a matriz de resíduos, relacionada ao número de variáveis latentes escolhido.

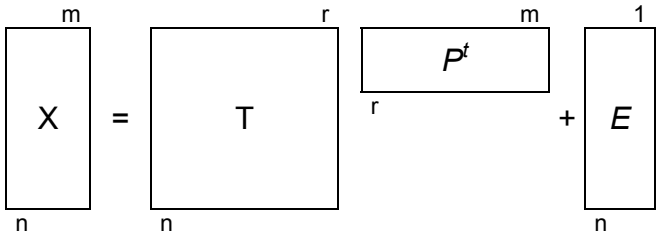
As próprias matrizes M, portanto, constituem as chamadas variáveis latentes e são formadas pelo produto de dois vetores, **t** (scores) e **p** (loadings) conforme as expressões abaixo (LIMA, 2000):

$$X = t_1.p_1^t + t_2.p_2^t + ... + t_v.p_a^t + E$$

ou

$$X = TP^t + E$$

Também graficamente podendo ser representada por:



Também a matriz Y é decomposta de forma semelhante, resultando em uma soma de produtos de *scores* e *loadings* somados à matriz de resíduos correspondente. A relação entre X e Y será obtida correlacionando-se, linearmente, os scores de cada bloco de dados.

O melhor modelo possível é aquele em que se consegue obter as menores matrizes de resíduos nas matrizes, ao mesmo tempo em que se obtém a melhor

relação linear entre os scores de X e Y. No PLS isto é alcançado por meio de uma ligeira mudança nos valores dos scores, de forma e produzir a melhor relação possível (LIMA, 2000).

A vantagem deste método sobre o PCR está no fato de não haver limitação quanto ao número de amostras necessárias para determinação de b, uma vez que o número de variáveis independentes (y) não importa, mas sim o número de variáveis latentes necessárias à descrição satisfatória da variância do sistema (LIMA, 2000).

3.5.3 Validação do Modelo de Calibração

Construído o modelo, é necessário avaliar sua capacidade de realizar determinações (capacidade preditiva). A validação consiste em testar o modelo prevendo concentrações de amostras (de preferência não usadas na sua construção), para estabelecer se ele de fato irá refletir o comportamento do analito de interesse (COSCIONE, 2001; FERREIRA *et al.*, 1999). É importante destacar que o termo validação de que tratam os autores neste momento não leva em consideração todos os fatores levantados pela ANVISA (2003) e ICH (1996) e que serão discutidos mais adiante.

Duas estratégias básicas de validação do modelo são a *validação externa*, em que novos dados são introduzidos para avaliar a capacidade preditiva do modelo, e a *validação interna*, em que o conjunto original de calibração serve também como conjunto de validação (COSCIONE, 2001). A validação externa é recomendada por utilizar amostras não utilizadas na construção do modelo de calibração. Caso estas amostras não estejam disponíveis, a metodologia de *validação cruzada* pode ser utilizada como estratégia de validação interna. Nesta forma, seleciona-se subconjuntos do conjunto de calibração que serão utilizados no cálculo do modelo. O processo *"leave-one-out"*, que consiste em deixar de fora

do modelo uma amostra de cada vez pode ser utilizada e, freqüentemente, produz bons resultados (COSCIONE, 2001; FERREIRA *et al.*, 1999).

Durante o processo de validação, ainda, dois fatores devem ser considerados (FERREIRA *et al.*, 1999):

- O número de variáveis latentes a ser utilizado no modelo;
- A detecção de amostras anômalas.

3.5.3.1 Escolha do Número de Variáveis Latentes

Variáveis latentes (denominados também de fatores, componentes principais ou autovetores) são obtidas a partir da manipulação dos dados da matriz pelo *software.* Este processo tem por objetivo representar o conjunto de dados em um novo sistema de eixos, a fim de visualizar sua natureza multivariada em poucas dimensões. Essa análise estatística é denominada *Principal Component Analysis* (PCA) e constitui a base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados (FERREIRA *et al.*, 1999). O resultado dessa análise estatística será um número mínimo de variáveis latentes que represente acima de 99% o sistema em estudo.

De forma geral, quanto maior o número de variáveis latentes empregados na modelagem, melhor será a linearidade dos resultados e, conseqüentemente, menor o erro de calibração, visto que mais informações do espectro são modeladas. Entretanto, o cálculo do erro não acompanha este raciocínio, tendendo a atingir um mínimo e depois aumentar conforme são utilizadas mas variáveis latentes (KONZEN, 2003).

3.5.3.2 Previsão do Modelo de Calibração para Amostras Testes

A previsão do modelo de calibração para amostras testes, no contexto da validação interna, considera mesmo conjunto de amostras utilizadas na construção do modelo. Nesta fase, o que se procura é comparar os resultados previstos pelo modelo com os resultados esperados para as amostras. Essa comparação pode ser feita pelo cálculo do erro médio de previsão (mean square error of prediction – MSEP) e pela raiz quadrada do erro médio de previsão (root mean square error of prediction – RMSEP); grandezas que indicadores do desempenho do modelo construído.

3.5.3.3 Detecção de anomalias

A detecção de amostras anômalas (*"outliers"*) também é importante na verificação da qualidade do conjunto de calibração e visa assegurar que as amostras formam um conjunto homogêneo, removendo-se aquelas que fujam ao padrão estabelecido. As duas grandezas utilizadas na detecção de amostras anômalas são a *"Leverage"* e os resíduos de Student:

- A *"Leverage"* é uma medida que indica o grau de influência de uma amostra isolada no conjunto da calibração. Casos em que as medidas experimentais de uma amostra em particular sejam muito diferentes das outras amostras podem influenciar negativamente o conjunto de calibração. Amostras com valores dessa grandeza fora dos padrões podem necessitar exclusão do conjunto de calibração.

- Os resíduos de Student consistem no resíduo das concentrações e medem também a influência de uma amostra em particular no conjunto de calibração. O objetivo é determinar se a amostra analisada está dentro de uma distribuição com nível de confiança de 95%. Para isso, normalmente

se aplica um teste *t* como indicativo, buscando valores dentro de um desvio padrão de ±2,5.

Estas duas grandezas têm caráter complementar e a análise do gráfico dos resíduos de Student versus *"Leverage"* para cada amostra é a melhor maneira de se determinar amostras anômalas. Amostras com altos resíduos, mas com pequena "leverage" provavelmente têm algum erro no valor da concentração, que pode ser medida novamente. Outra opção será a exclusão de tal amostra do conjunto de calibração. Amostras com resíduo e "leverage" altos devem sempre ser excluídas e o modelo de calibração reconstruído (FERREIRA *et al.*, 1999).

Depois de construídos e otimizados, os modelos desenvolvidos estão prontos para determinações de propriedades de amostras desconhecidas. Para isso, será necessário alimentar o sistema informático com nova matriz de dados dessas amostras, submetendo-as à analise do modelo construído. A resposta será fornecida na forma de uma matriz contendo em suas linhas as amostras analisadas e em suas colunas a(s) propriedade(s) determinada(s) (COSCIONE, 2001).

3.5.4 Aplicações de Interesse Farmacêutico

O processo de calibração multivariada tem sido bastante utilizado em análises farmacêuticas, principalmente para amostras compostas por múltiplos componentes ou interferentes, partindo-se de dados instrumentais de baixa seletividade (MILLER, 1995). Utilizando-se este processo, o espectrofotômetro UV-VIS pode ter compensada sua baixa seletividade de determinação, tornando-se um instrumento analítico bastante valioso, considerando suas outras características como baixo custo, alta sensibilidade e facilidade operacional (SOUZA & PERALTA-ZAMORA , 2001). Alguns trabalhos recentes de interesse farmacêutico utilizando calibração multivariada como método são citados abaixo.

NEPOTE, DAMIANI & OLIVIERI (2003) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação simultânea de fosfato sódico de dexametasona, vitamina B6 e B12 em solução estéril injetável utilizando calibração multivariada. O modelo se baseou na análise PLS e sua capacidade preditiva foi comparável ao método padrão (eletroforese capilar).

Utilizando método espectrofluorométrico, MARTOS *et al.* (2000) desenvolveram modelo multivariado para determinação simultânea de ácido acetilsalicílico, codeína e piridoxina em formulações farmacêuticas. O método utilizado foi o PLS e os resultados mostraram-se satisfatórios em comparação com a cromatografia. Os autores argumentam a vantagem do modelo multivariado em relação à cromatografia em termos de tempo de processamento das amostras e custo da análise.

GOICOECHEA & OLIVIERI (1999) desenvolveram um método PLS para determinação de rifampicina, isoniazida e pyrazinamida em comprimidos, utilizadas no tratamento da tuberculose. Os resultados mostraram-se exatos, precisos, relativamente rápidos e sem necessidade de dissolução das amostras em meio não aquoso. Para o modelo desenvolvido, não houve interferência de excipientes presentes na forma sobre os valores previstos, demonstrando boa especificidade.

3.6 ALGUNS CONCEITOS EM ESTATÍSTICA

Quando se procura analisar a correlação entre dois conjuntos dados, onde há uma variável independente e uma variável dependente (que tem seu valores ligados de forma linear à variável independente), pode-se utilizar a técnica estatística conhecida como regressão linear simples (TRIOLA, 1995). Em muitos casos, no entanto, o que se necessita é analisar como uma variável dependente

pode ser afetada por mais de uma variável independente. Como exemplo, pode-se citar a relação entre a absorvância de uma determinada substância em vários comprimentos de onda (variáveis independentes) e sua concentração em um determinado meio (variável dependente). Em tais casos, deve-se aplicar uma técnica chamada regressão múltipla (DOWNING & CLARK, 1999).

Na regressão múltipla, em princípio, o procedimento é bastante semelhante à regressão linear simples. Há, entretanto, duas diferenças principais entre a regressão simples e a regressão múltipla (DOWNING & CLARK, 1999):

- Não se pode traçar um gráfico da relação, principalmente se houver mais de duas variáveis independentes. Matematicamente, pode-se considerar cada observação como definindo um ponto no espaço multidimensional e, então, o objetivo da regressão múltipla é achar algo chamado *hiperplano* que melhor se ajuste a todas as observações.

- O processo de cálculo é mais difícil para a regressão múltipla do que para a regressão simples, por isso os cálculos são feitos por computador.

Na regressão simples, duas grandezas avaliam a relação entre os conjuntos de dados: o coeficiente de correlação e o coeficiente de determinação. Além desses, é possível ainda realizar uma análise de resíduos, com a finalidade principal de identificar valores discrepantes.

O coeficiente de correlação linear (r) mede a grandeza da correlação linear entre variáveis intituladas x e y em uma determinada amostra. O r é também chamado de coeficiente de correlação do produto do momento de Pearson, em homenagem a Karl Pearson, que originalmente o desenvolveu (TRIOLA, 1995). Seu valor pode variar de 0 a 1 e indicará melhor correlação quanto mais próximo de 1 estiver.

O coeficiente de determinação (r^2) indica a precisão da reta de regressão, Isto é, o grau de ajuste da reta aos dados. Também estará sempre entre 0 e 1 e tem interpretação semelhante ao coeficiente de correlação. Utiliza-se o símbolo r^2 porque é o quadrado do coeficiente de correlação amostral entre as duas variáveis (DOWNING & CLARK, 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PRESCRIÇÕES DE ÁCIDO KÓJICO

Para caracterização das prescrições contendo ácido kójico foram analisadas receitas de agentes clareadores aviadas em farmácias de manipulação localizadas em Curitiba no período de maio a agosto de 2003. Foram consideradas prescrições contendo um ou mais dos seguintes agentes clareadores:

a) Ácido Kójico;
b) Ácido Glicólico;
c) Ácido Retinóico;
d) Ácido Fítico;
e) Hidroquinona.

Para cada prescrição foram observadas as seguintes variáveis: 1) Presença ou não de ácido kójico na formulação prescrita, 2) concentração de ácido kójico prescrita e 3) ocorrência de associação com outro agente clareador ou de forma isolada. Os dados foram analisados por estatística descritiva.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento e validação de um método por calibração multivariada para determinação do ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico foi realizado em duas etapas bem distintas: A) Num primeiro momento, foram construídos e testados internamente dois modelos multivariados a partir de dois conjuntos de calibração de amostras distintas, denominadas amostras padrão e amostras creme (item 4.2.2); B) Uma vez calibrados e testados, os resultados dos dois modelos sofreram análise comparativa a fim de selecionar o modelo de

melhor resultado. Este modelo, então, foi avaliado segundo critérios de validação determinados pela legislação brasileira e recomendações internacionais. O fluxograma geral referente a esse processo encontra-se na Figura 8.

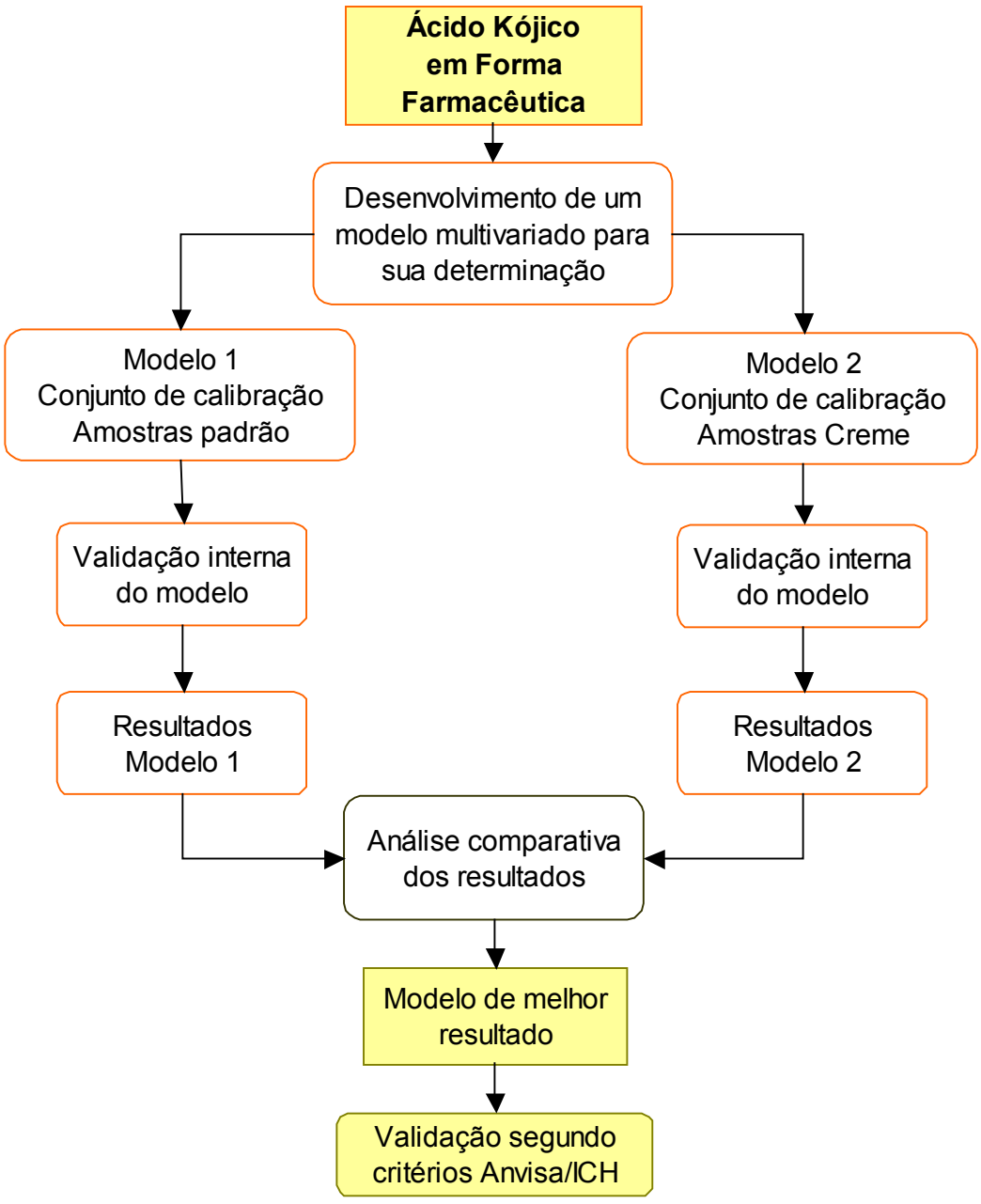


Figura 8. Fluxograma geral do desenvolvimento e validação de um método por calibração multivariada para determinação do ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico

4.2.1 Materiais e equipamentos

Durante o preparo das formas farmacêuticas e soluções foi utilizado ácido kójico padrão, adquirido junto à Sigma Aldrich Chem. Co., e cera auto-emulsionante não iônica da marca Emulgade Wax[2]. Todas as soluções aquosas utilizaram água deionizada e as soluções alcoólicas, álcool etílico absoluto padrão analítico.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica, incluindo balões volumétricos e pipetas graduadas ou volumétricas calibradas. As pesagens foram realizadas em balança digital analítica Mettler Toledo AG 245. As medidas de pH foram feitas com pHmetro digital PG2000 marca Gehaka e HI8519 N, marca Hanna Instruments. O ajuste dos pHmetros foi feito com soluções padrão (pH 7; pH 10) certificadas.

O equipamento utilizado na obtenção dos espectros foi o espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu UV-1601PC acoplado ao software UVPC v.3.91 da Shimadzu. Na construção das matrizes de dados e modelo de calibração foram utilizados os softwares Microsoft Excel®, Origin Pro 6.1® e PLS-toolbox 1.5, em ambiente Matlab v.4.2.

4.2.2 Planejamento de amostras testes

Para construção dos modelos de calibração multivariada foram utilizados dois conjuntos de amostras testes.

O primeiro conjunto, denominado *amostras padrão*, foi composto de 10 amostras de solução aquosa com concentrações de ácido kójico de 1,5 a 30μg/ml

[2] Emulgade Wax é marca registrada. O produto é composto de uma associação entre álcool cetoestearílico etoxilado, estearato de sorbitano e monooleato de sorbitano etoxilado (20 OE).

(1,5; 2,5; 5,0; 8,0; 10,0; 12,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0μg/ml) em volume final de 100 ml, preparadas a partir de diluições de solução concentrada contendo 500 μg/ml (Tab. 4). Essas amostras foram preparadas a partir de uma única pesagem utilizada na preparação da solução concentrada.

Tabela 4. Esquema de diluições no preparo das amostras padrão utilizadas na construção do modelo de calibração.

Concentração desejada	Volume de solução ácido kójico 500 μg/ml	Volume Final
1,5 μg/ml	0,3 ml	100 ml
2,5 μg/ml	0,5 ml	100 ml
5,0 μg/ml	1,0 ml	100 ml
8,0 μg/ml	1,6 ml	100 ml
10,0 μg/ml	2,0 ml	100 ml
12,0 μg/ml	2,4 ml	100 ml
15,0 μg/ml	3,0 ml	100 ml
20,0 μg/ml	4,0 ml	100 ml
25,0 μg/ml	5,0 ml	100 ml
30,0 μg/ml	6,0 ml	100 ml

O segundo conjunto, denominado *amostras creme*, foi composto de 10 amostras de solução alcoólica com concentrações de ácido kójico de 4,0 a 30μg/ml (4,0; 8,0; 10,0; 12,0; 16,0; 18,0; 20,0; 24,0; 28,0 e 30,0μg/ml) em volume final de 100 ml, preparadas a partir de diluições de solução concentrada contendo 200 μg/ml em volume final de 500ml (Tab. 5). Nessas amostras creme foi adicionado ao balão utilizado no preparo da solução concentrada 5g de veículo a base de Emulgade® Wax[3], sem ácido kójico, de modo a compor na solução a mesma proporção fármaco/veículo encontrada em um creme contendo 2% de ácido kójico. Foi preparada ainda solução contendo 5 g de veículo Emulgade®

[3] Formulação do veículo: Gel creme com base auto emulsionante não iônica (Emulgade® Wax) contendo: Emulgade Wax 15%, Natrosol 0,5%, Nipagin 0,2%, Triglicerídeo ácido cáprico 10%, Propilenoglicol 8%, BHT (butilhiudroxitouleno) 0,2%, EDTA 0,2% e Água destilada q.s.p. 100g.

Wax em volume final de 500ml, sem adição de ácido kójico. As amostras creme utilizadas na composição do modelo multivariado foram preparadas de modo a se obterem diferentes concentrações de ácido kójico em cada um dos balões, mantendo constante a quantidade de veículo por balão.

Tabela 5. Esquema de diluições no preparo das amostras creme utilizadas na construção do modelo de calibração.

Concentração desejada	Volume de solução ácido kójico 200 μg/ml + veículo	Volume de solução contendo somente veículo	Volume Final
4,0 μg/ml	2,0 ml	13,0 ml	100 ml
8,0 μg/ml	4,0 ml	11,0 ml	100 ml
10,0 μg/ml	5,0 ml	10,0 ml	100 ml
12,0 μg/ml	6,0 ml	9,0 ml	100 ml
16,0 μg/ml	8,0 ml	7,0 ml	100 ml
18,0 μg/ml	9,0 ml	6,0 ml	100 ml
20,0 μg/ml	10,0 ml	5,0 ml	100 ml
24,0 μg/ml	12,0 ml	3,0 ml	100 ml
28,0 μg/ml	14,0 ml	1,0 ml	100 ml
30,0 μg/ml	15,0 ml	-	100 ml

4.2.3 Obtenção dos espectros

Os espectros ultravioleta de absorção do ácido kójico das amostras padrão foram obtidos a partir da leitura na faixa de 200-350nm, em intervalos de 1nm, feita em cubeta de quartzo à temperatura ambiente (T) de 25°C e tendo água como branco. Os espectros das amostras creme foram obtidos sob as mesmas condições, porém tendo álcool etílico absoluto como branco. As informações geradas nas leituras no espectrofotômetro nos diferentes comprimentos de onda foram transmitidas em formato ASCII, sendo este compatível com o programa de modelamento multivariado (Matlab v.6.0)

4.2.4 Construção dos modelos de calibração

Foram construídos dois modelos de calibração, utilizando os dados dos conjunto de amostras padrão e amostras creme. Esses dados foram obtidos a partir dos espectros no ultravioleta e organizados na forma de matrizes, de modo a poderem ser analisados pelo programa Matlab v.4.2. As linhas das matrizes são os objetos (amostras) e as colunas da matriz são as variáveis (valores de absorvância . nos diferentes comprimentos de onda).

Dois conjuntos semelhantes de duas matrizes cada (X e Y) foram formados a partir das amostras padrão e creme. As matrizes X foram compostas de 10 linhas, correspondentes às 10 amostras utilizadas, e 151 colunas, correspondentes ao intervalo de comprimentos de onda em que foram lidas as amostras (200-350 nm). A matriz de concentração (Y) foi formada usando as 10 linhas das amostras e as concentrações conhecidas das amostras em uma única coluna. Ambos os conjuntos de dados foram processados a fim de se obterem dois modelos de calibração multivariada.

Antes do modelamento, foi selecionada a faixa espectral (intervalo de comprimentos de onda) cujos dados seriam considerados. Esse procedimento é feito com intuito de se diminuir o erro causado pela consideração de regiões espectrais inúteis, não lineares ou com ruído espectral. A escolha da faixa espectral foi feita com base na análise em espectro de correlação (r^2 vs λ) conforme descrito por OLIVEIRA *et al.* (2004). Neste trabalho, foram considerados os comprimentos de onda que apresentaram r^2 superior a 0.99, indicando linearidade entre concentração e sinal instrumental.

Durante o modelamento, os dados das matrizes X e Y foram centrados na média. Esta operação consiste em subtrair o valor de cada elemento da coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, resultando numa matriz onde todas

as colunas têm médias iguais a zero, reduzindo assim a dimensão do modelo (THOMAS, 1994).

O método de calibração empregado foi de regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) que, conforme descrito anteriormente, utiliza-se da decomposição das matrizes X e Y em variáveis latentes, mais uma matriz de resíduos correspondentes aos dados não modelados. Essas variáveis são utilizadas na obtenção dos coeficientes de regressão do modelo de calibração construído. O número ótimo de variáveis latentes para o modelo foi escolhido com base na análise da soma dos quadrados do erro de previsão (PRESS), utilizando-se o sistema de validação cruzada *leave-one-out*, que consiste em deixar de fora uma das amostras do conjunto de calibração por vez, prevendo a concentração dessa amostra com o modelo então construído sem ela. Isso é repetido para cada uma das amostras até que cada amostra tenha sido excluída uma vez da calibração. O erro de previsão é obtido comparando-se a concentração prevista de cada amostra com seu valor verdadeiro indicado na matriz Y. A somatória dos quadrados do erro de previsão PRESS é definida como:

$$\text{PRESS} = \Sigma (y' - y)^2$$

onde y' é o valor conhecido e y é o valor calculado.

Após a calibração do sistema, as próprias amostras do conjunto de calibração podem ser utilizadas para analisar a capacidade de previsão do modelo. Neste trabalho, a habilidade de previsão para o PLS foi estimada pelo procedimento de validação interna cruzada, empregando o método que deixa uma amostra de fora da calibração por vez. O desempenho do modelo foi avaliado pelo cálculo do erro médio de previsão (mean square error of prediction – MSEP), dado pela fórmula

$$MSEP = \frac{\Sigma (y' - y)^2}{n}$$

e pela raiz quadrada do erro médio de previsão (root mean square error of prediction – RMSEP), dada pela fórmula

$$RMSEP = [\Sigma (y' - y)^2/n]^{1/2}$$

em que y' é o valor conhecido, y é o valor calculado e n é o número de amostras (SENA & POPPI, 2004; SALES, CALLAO & RIUS, 1997).

Uma demonstração visual do desempenho da calibração foi feita pela observação do gráfico das concentrações conhecidas em função das concentrações calculadas. Para esses dois conjuntos de valores, foi calculado o coeficiente de correlação (r), dado pela fórmula

$$r = \frac{n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{[(n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2)\,(n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2)]^{1/2}}$$

e o coeficiente de determinação (r^2), dado pelo quadrado do coeficiente de correlação, a fim de se avaliar a relação linear entre eles e o ajuste da reta aos dados (DOWNING & CLARK, 1999).

Os modelos de calibração a partir de amostras padrão e creme foram ambos testados quanto ao seu poder de previsão. O modelo a partir de amostras padrão foi testado nas próprias amostras padrão e nas amostras creme e o modelo a partir de amostras creme, somente nas amostras creme. Os resultados foram avaliados separadamente e comparados a fim de selecionar o modelo de melhor desempenho.

Ainda durante a fase de construção do modelo, é necessário identificar a presença de anomalias (*outliers*) no conjunto de amostras. Essas representam, em geral, dados que são irrelevantes, erros grosseiros ou de algum modo anômalos, quando comparados com a maioria dos dados. Para detecção de anomalias foram utilizadas as grandezas leverage, que mede a influência de uma amostra no conjunto de calibração (FERREIRA *et al.*,1999), e resíduos de Student, que consistem em uma estimativa do resíduo para uma amostra que não foi usada no modelo de calibração com ajuste para obter uma distribuição normal (MESSERSCHIMIDT, 1999).

A "leverage" (h_i) pode ser interpretada geometricamente como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados e é calculada segundo a equação

$$h_{ii} = \frac{1}{n} + (\mathbf{x_i} - \bar{\mathbf{x}})^t (\mathbf{X}^t\mathbf{X})^{-1} (\mathbf{x_i} - \bar{\mathbf{x}})$$

onde x_i é o espectro da *i*ésima amostra, $\bar{\mathbf{x}}$ é o espectro médio e X^tX é a matriz de variância-covariância. Pela expressão acima, vê-se que a "leverage" é uma função da distância da amostra à média e das correlações entre as variáveis (FERREIRA *et al.*, 1999). O valor máximo permitido de “leverage“ é obtido pela expressão 3VL/n, em que VL corresponde ao número de variáveis latentes (componentes principais) e “n” o número de amostras utilizadas.

Para cálculo dos resíduos Studentizados para cada amostra i utilizou-se a fórmula:

$$Lresc_i = \sqrt{\frac{(c - c_i)^2}{(n-1)(\hat{1} - h_i)}}$$

$$\text{Resíduo de Student}_i = \frac{(c - c_i)}{Lresc\sqrt{\hat{1} - h_i}}$$

onde c é o valor conhecido da amostra, c_i é o valor previsto, h_i é o leverage e $Lresc_i$ é o resíduo da concentração da amostra *i* corrigido pela "leverage". Como os resíduos de Student são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio, os valores além de ±2,5 (nível de confiança de 95%) são considerados altos sob as condições usuais de estatística (FERREIRA *et al.*, 1999).

4.2.5 Comparação dos modelos de calibração

Os modelos de calibração produzidos a partir dos conjuntos de amostras padrão e creme foram comparados em sua capacidade preditiva das amostras creme (amostras de interesse) pela análise do MSEP e RMSEP. Foi aplicado aos conjuntos de dados, ainda, o teste estatístico F que fornece a probabilidade dos valores não serem diferentes. Um valor de F igual a 1 indica que os valores reais e previstos são idênticos. Dessa forma, quanto mais próximo a 1 estiver o F, melhor será o modelo avaliado.

4.2.6 Validação do modelo de calibração

A partir da análise comparativa dos modelos de calibração construídos a partir dos conjuntos de amostras padrão e creme, o modelo de melhor desempenho foi validado segundo critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio de sua resolução n°899/03 (ANVISA, 2003), e considerando critérios internacionais para validação de procedimentos analíticos

(ICH, 1996). Os indicadores avaliados foram a especificidade, a linearidade, o intervalo, a precisão, a exatidão e a robustez.

4.2.6.1 Especificidade

A especificidade do modelo multivariado sob validação foi avaliada comparando-se os resultados de seu ensaio de recuperação (exatidão) com o método espectrofotométrico convencional (univariado). Os dados foram apresentados em tabela comparativa dos resultados de recuperação dos dois métodos.

A construção da curva padrão do método convencional e determinação das amostras seguiu a metodologia validada anteriormente por GOMARA (2003) e os resultados foram comparados em termos de percentagem de recuperação.

Para obtenção da curva de calibração convencional do ácido kójico foram preparadas soluções aquosas contendo ácido kójico nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 μg/ml em volume final de 100 ml. Estas soluções foram preparadas em triplicata a partir de solução concentrada contendo 500 μg/ml de ácido kójico (Tab. 6), sendo esta pesada e preparada em três dias diferentes, de modo a se obterem 9 amostras para cada concentração.

Tabela 6. Esquema de diluições no preparo das soluções de ácido kójico utilizadas na construção da curva de calibração.

Concentração desejada	Volume de solução ácido kójico 500 μg/ml	Volume Final
5,0 μg/ml	1,0 ml	100 ml
10,0 μg/ml	2,0 ml	100 ml
15,0 μg/ml	3,0 ml	100 ml
20,0 μg/ml	4,0 ml	100 ml
25,0 μg/ml	5,0 ml	100 ml
30,0 μg/ml	6,0 ml	100 ml

Cada solução teve sua absorção lida em 269nm, em triplicata, totalizando 9 medidas instrumentais para cada amostra. A partir dos resultados foi calculada a média de absorção para cada amostra e construída uma curva padrão com valores de concentração (x) e absorvância (y). A linearidade foi determinada pelos coeficientes de correlação e determinação e foi obtida a equação da reta.

Com essas informações, foi determinada a concentração de ácido kójico nas mesmas amostras utilizadas no ensaio de exatidão do modelo multivariado e foi calculada a percentagem de recuperação para o método convencional.

4.2.6.2 Linearidade

Considerando que o conjunto de sinais instrumentais do analito constitui matrizes com diversos comprimentos de onda, não é possível construir um gráfico considerando somente um valor de λ. Assim, para avaliação da linearidade do modelo multivariado, construiu-se um gráfico considerando os valores reais de concentração das amostras em função dos valores previstos pelo modelo. Esta curva considerou os valores das 10 amostras que compunham o modelo na análise de regressão linear, com cálculo do coeficiente de correlação (r), determinação (r^2), intersecção com o eixo Y e inclinação da reta.

4.2.6.3 Intervalo

A definição da faixa de trabalho do modelo multivariado deve considerar a concentração mediana do conjunto de calibração, modelando então pontos de concentração ao redor desse valor. No caso da quantificação do ácido kójico, a concentração obtida após extração a partir da forma farmacêutica foi de 20 μg/ml. Dessa forma, na definição da faixa de trabalho do método considerou-se no planejamento experimental o preparo de amostras variando de 20% a 150% desse valor, atendendo especificações normativas que estabelecem a variação mínima

de 80 a 120% (ANVISA, 2003). A capacidade do método em trabalhar na faixa estipulada foi avaliada pelos resultados de linearidade apresentados nesse intervalo.

4.2.6.4 Precisão

Os ensaios de precisão realizados na avaliação do modelo multivariado foram a repetibilidade (intra-corrida) e a precisão intermediária (inter-corridas).

Para ensaio de repetibilidade, foram preparadas soluções de AK nas concentrações de 16, 20 e 24 μg/ml a partir da diluição de solução estoque filtrada contendo 200 μg/ml de AK mais veículo Emulgade Wax® (Tab. 7). Cada solução foi preparada em triplicata e foram feitas para cada uma três leituras na faixa de 200 a 350nm (n=9). Os resultados de previsão pelo modelo multivariado a partir desses espectros foram comparados pela média, desvio padrão e coeficiente de variação. Foram consideradas satisfatórias variações inferiores a 5%.

Tabela 7. Esquema de diluições no preparo das amostras utilizadas no ensaio de repetibilidade.

Concentração Desejada (μg/ml)	Volume de solução ácido kójico 200 μg/ml + veículo	Volume de solução contendo somente veículo	Volume Final
16,0	8 ml	7 ml	100 ml
20,0	10 ml	5 ml	100 ml
24,0	12 ml	3 ml	100 ml

Para ensaio de precisão intermediária, foram refeitos os procedimentos de repetibilidade em dois dias diferentes, por analistas diferentes, no mesmo laboratório e equipamentos. Os resultados de previsão pelo modelo multivariado a partir desses espectros foram comparados pela média, desvio padrão e

coeficiente de variação. Foram consideradas satisfatórias variações inferiores a 5%.

4.2.6.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaio de recuperação, em que quantidades conhecidas de AK padrão de referência foram incorporadas ao veículo emulgade Wax® e posteriormente determinadas pelo método multivariado.

Para tanto, foram preparadas três amostras de creme contendo 1%, 2% e 3% de AK, respeitando-se a composição original do veículo usado. Quantidades adequadas de cada amostra foram transferidas quantitativamente para balões de 500 ml de modo a se obterem soluções finais de 100, 200 e 300 μg/ml para os cremes a 1%, 2% e 3%, respectivamente. Essas soluções foram filtradas em filtro qualitativo e diluídas em triplicata obtendo-se soluções finais de AK com 20 μg/ml (cremes 1% e 2%) e 15 μg/ml (creme 3%). Cada solução foi lida em triplicata na faixa de 200 a 300 nm para obtenção dos espectros. Os valores de absorvância em 269 nm foram também registrados para determinação pelo método convencional (espectrofotometria univariada).

4.2.6.6 Robustez

Os parâmetros de robustez do modelo multivariado analisados foram a influência da temperatura, do tempo de leitura e do pH.

A influência da temperatura foi avaliada a partir do preparo de solução contendo AK 20 μg/ml mais veículo em quantidade proporcional (Tab. 5; p.56) da qual foram separadas três alíquotas de volume semelhante. Estas foram acondicionadas de modo a atingirem as temperaturas desejadas e os espectros foram lidos imediatamente. As temperaturas medidas foram 5, 10, 15, 20, 25 e 35

°C. Os resultados foram avaliados na forma de um gráfico, contendo os espectros da solução em diferentes temperaturas e a partir da determinação da concentração de AK dessas amostras pelo modelo multivariado sob validação.

Para análise da influência do tempo de leitura no comportamento espectral do AK foi preparada solução contendo AK 18 μg/ml + veículo em quantidade proporcional (Tab. 5; p.56) e foram obtidos espectros no tempo zero, 2, 5 e 24 horas depois do preparo. Os resultados foram avaliados na forma de um gráfico, contendo os espectros da solução nos diferentes tempos e a partir da determinação da concentração de AK dessas amostras pelo modelo multivariado sob validação.

A influência do pH foi medida a partir do preparo de soluções contendo AK 20 μg/ml mais veículo em diferentes valores de pH, utilizando soluções tampão conforme especificado na (Tab.8). Os valores de absorção foram lidos na faixa de 200 a 400 nm contra branco de idêntica composição, sem adição do ácido kójico, e comparados de modo a se observarem possíveis mudanças no comportamento espectral do sistema.

Tabela 8. Soluções creme de AK 20 μg/ml em diferentes valores de pH.

Conc. Desejada (μg/ml)	Volume de solução ácido kójico 200 μg/ml + veículo (ml)	Volume de solução tampão (ml)	Volume de álcool absoluto (ml)	Tampão utilizado	*pH da solução*
20,0	10,0	80,0	10,0	HCl – KCl	*2,0*
20,0	10,0	80,0	10,0	Ácido acético – Acetato	*5,5*
20,0	10,0	80,0	10,0	Na2HPO4 – KH2PO4	*7,0*
20,0	10,0	80,0	10,0	H3BO3.KCl - NaOH	*8,5*
20,0	10,0	80,0	10,0	H3BO3.KCl - NaOH	*10,0*

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DAS PRESCRIÇÕES DE ÁCIDO KÓJICO

Para realização do estudo, foram amostradas 10 farmácias de manipulação do município de Curitiba (6,4 % do total de farmácias), das quais 6 concordaram em participar. Cada uma delas recebeu um protocolo de pesquisa, com instruções detalhadas sobre o levantamento (ANEXO 1). A partir da análise desse protocolo, 2 farmácias alegaram impedimento técnico (software e recursos humanos) para execução do trabalho. Nas 4 farmácias restantes, foram analisadas 2.757 prescrições aviadas no período de maio a agosto de 2003 contendo um ou mais dos agentes clareadores: ácido kójico, ácido glicólico, ácido retinóico, ácido fítico, hidroquinona.

Os critérios de escolha das prescrições e dos agentes clareadores basearam-se na freqüência de manipulação dos agentes relatada pelas farmácias participantes e com base na revisão realizada sobre agentes despigmentantes. Além disso, a não disponibilidade de programas informatizados em todas as farmácias dificulta o trabalho de levantamento, levando à necessidade de priorização dos agentes estudados.

Do total de prescrições analisadas, 163 (5,91%) continham ácido kójico de forma isolada ou em associação com outros agentes despigmentantes. A concentração média de ácido kójico presente nas receitas analisadas foi de 2,13% (Mediana=2,0; DP=1,11; Mínimo=0,5%; Máximo=6,0%). A distribuição detalhada dessas concentrações encontra-se na Figura 9.

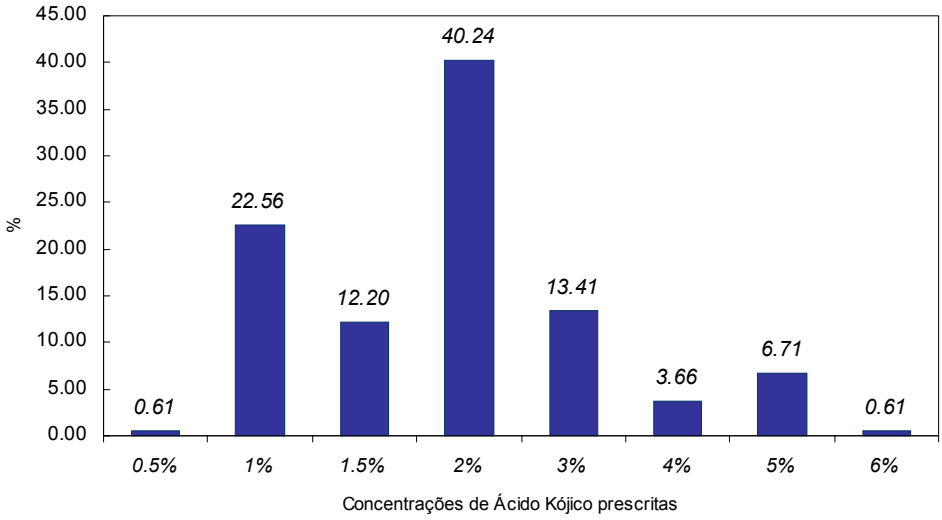


Figura 9. Freqüência de distribuição das concentrações de ácido kójico prescritas de forma isolada ou em associação no período de maio a agosto de 2003 em Curitiba-PR (n=163).

O ácido kójico foi prescrito isoladamente em 16,46% (n=163) das prescrições e em associação com todos os outros fármacos considerados no estudo, em especial o ácido glicólico (18,9%; n=163), o Ácido Retinóico (14,02%; n=163) e em associação tripla, com Hidroquinona e Ácido retinóico (14,02%; n=163). Os dados detalhados dessas associações estão na Tabela 9.

A partir da análise dos dados, observa-se que a prática da prescrição de associações de agentes clareadores é bastante comum e o ácido kójico é freqüentemente prescrito em associação com outros fármacos desse grupo. Considerando as prescrições que continham ácido kójico, a freqüência com que este é prescrito de forma isolada é significativa com relação a outras associações específicas, mas não com o total de associações prescritas. Além disso, os dados

do total de receitas analisadas sugerem uma não hegemonia do ácido kójico enquanto despigmentante indicado na prática médica.

Tabela 9. Freqüência de associações de ácido kójico com outros agentes clareadores prescritos no período de maio a agosto de 2003 em Curitiba-PR (n=163).

ASSOCIAÇÕES PRESCRITAS	n	FREQÜÊNCIA (%)
Ácido Kójico (não associado)	27	**16,46**
Ácido Kójico + Hidroquinona	16	9,76
Ácido Kójico + Ácido Glicólico	31	**18,90**
Ácido Kójico + Ácido Retinóico	23	**14,02**
Ácido Kójico + Ácido Fítico	08	4,88
Ácido Kójico + Hidroquinona + Ácido Glicólico	19	**11,59**
Ácido Kójico + Hidroquinona + Ácido Retinóico	23	**14,02**
Ácido Kójico + Ácido Fítico + Ácido Retinóico	05	3,05
Ácido Kójico + Ácido Fítico + Hidroquinona	01	0,61
Ácido Kójico + Ácido Fítico + Ácido Glicólico	03	1,83
Ácido Kójico + Ácido Fítico + Ácido. Retinóico + Hidroquinona	02	1,22
Ácido Kójico + Ácido Fítico + Ácido Glicólico + Hidroquinona	04	2,44
Ácido Kójico + Hidroquinona + Ácido Glicólico + Ácido Retinóico	01	0,61

Esse resultado é esperado considerando o longo tempo de permanência do ácido kójico no mercado de tratamento das hipermelanoses, desde a década de 80, e o surgimento de numerosos novos fármacos nos últimos anos, o que em muito ampliou as possibilidades de prescrição.

5.2 ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DO ÁCIDO KÓJICO

O espectro de absorção do ácido kójico solução 20 μg/ml (Fig.10) apresenta duas regiões de intensa absorção, com picos de absorvância em 269nm (A=1,1509) e 214nm (A=1,6954), resultados esses semelhantes ao encontrado por GOMARA et al. (2004).

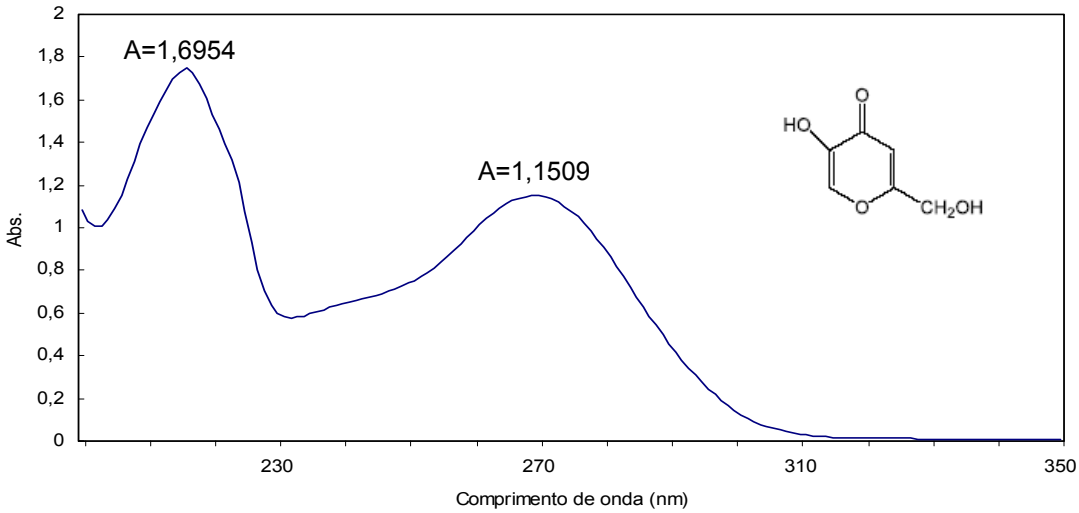


Figura 10. Espectro de absorção UV do ácido kójico. Solução aquosa 20μg/ml, T=25°C.

5.3 ESPECTRO NO ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS TESTES

5.3.1 Amostras Padrão

Os espectros de absorção das amostras testes padrão obtidos a partir da leitura de 10 amostras de solução aquosa com concentrações de ácido kójico de 1,5 a 30μg/ml na faixa de 200 a 350nm estão na figura 11.

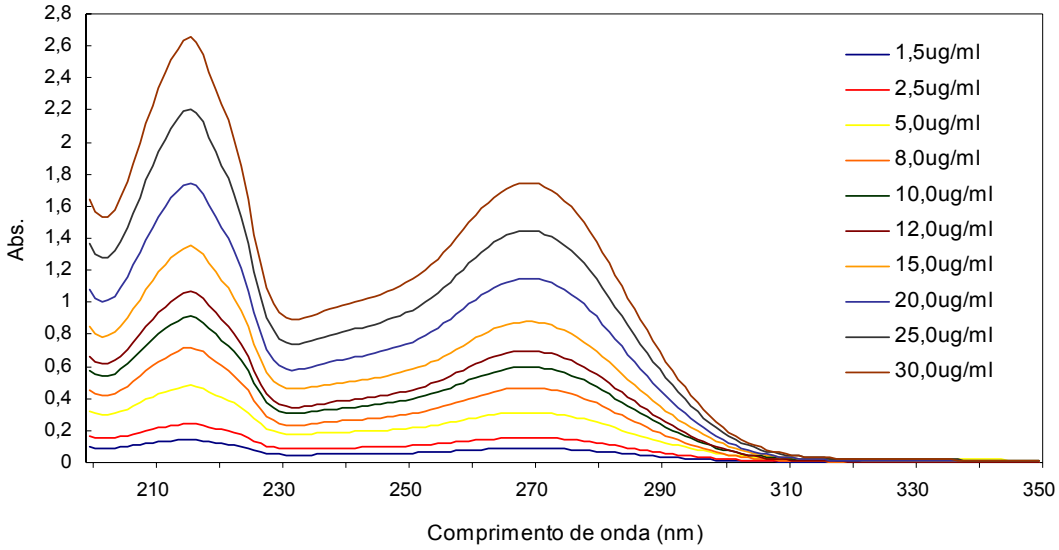


Figura 11. Espectros de absorção UV de soluções aquosas contendo ácido kójico 1,5-30,0μg/ml do conjunto de calibração de amostras padrão.

5.3.2 Amostras Creme

A figura 12 representa os espectros de absorção das amostras creme, obtidos a partir da leitura de 10 amostras de solução alcoólica contendo concentrações de ácido kójico de 4,0 a 30μg/ml e matriz (veículo) em quantidade proporcional (Item 4.2.2). O pH médio determinado das soluções foi de 6,46 (DP=0,15).

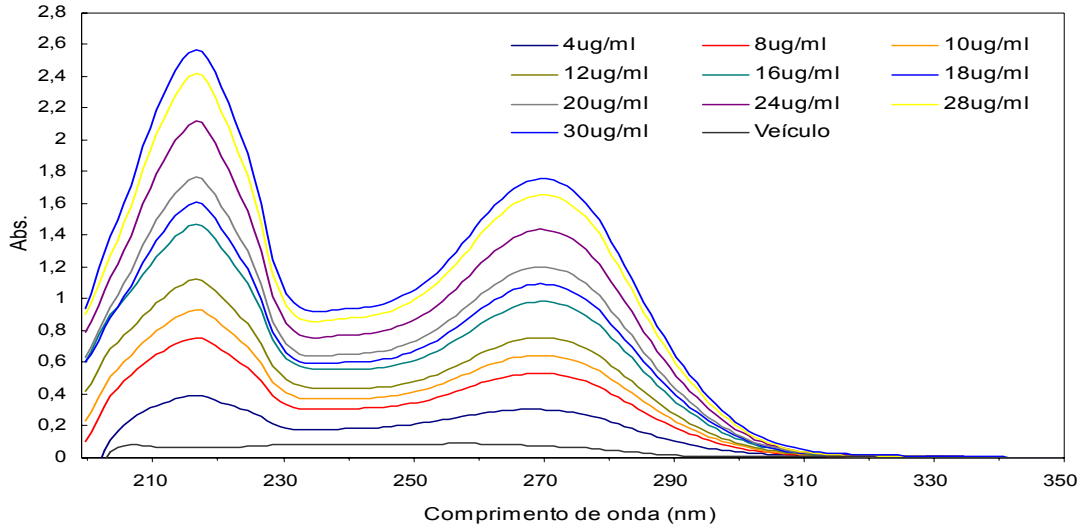


Figura 12. Espectros de absorção UV de soluções alcoólicas contendo ácido kójico 4,0-30,0μg/ml do conjunto de calibração de amostras creme. T=25°C

5.4 MODELOS DE CALIBRAÇÃO

Os modelos de calibração foram construídos utilizando-se todas as amostras cujos espectros foram analisados. Foram criados modelos a partir das amostras padrão e amostras creme.

5.4.1 Modelo a partir de amostras padrão

5.4.1.1 Seleção da Faixa Espectral

Os resultados de coeficiente de determinação (r^2) (Fig. 13), calculados para cada comprimento de onda na faixa de 200 a 350 nm no conjunto de amostras padrão, mostrou valores acima 0,99 na faixa de 200 a 300 nm, sendo os menores

de 0,9993 em 200 nm e 0,9922 em 300 nm. No gráfico, pode-se observar uma discreta queda nos valores de r^2 em 230 nm, o que condiz com o comportamento espectral do ácido kójico, em que essa região delimita duas áreas de intensa absorção. Da mesma forma, acima de 300 nm, há uma queda acentuada do valor de r^2, devido à quase nula absorção da substância nessa região. A utilização dessa faixa espectral na construção do modelo pode diminuir a interferência de ruídos e conseqüentemente o erro de previsão.

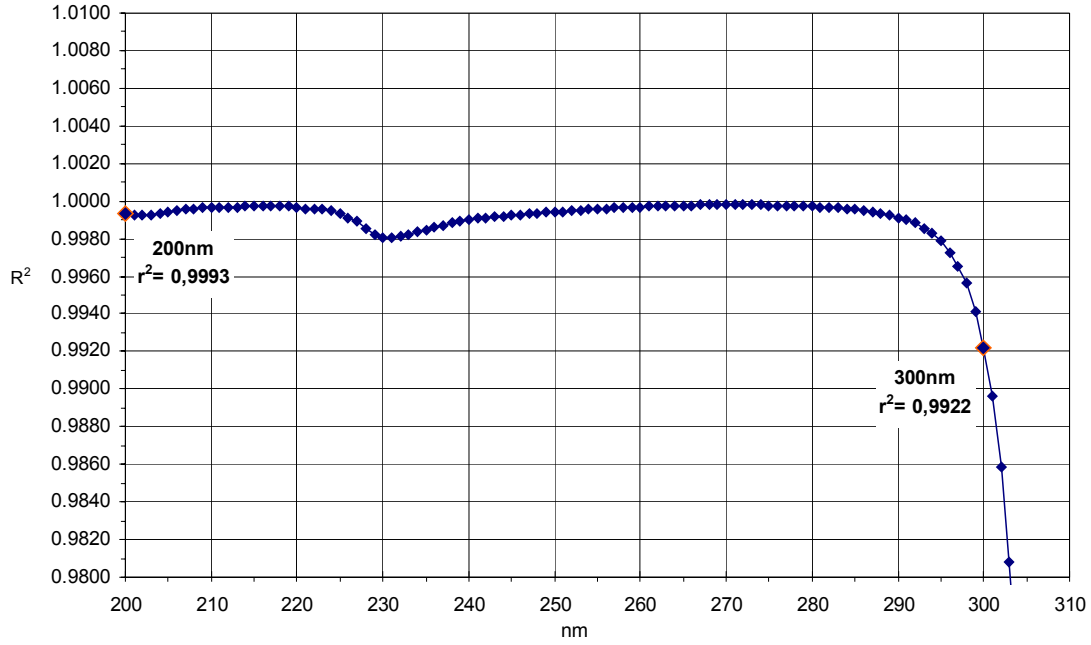


Figura 13. Espectro de correlação (r^2) para o conjunto de 10 amostras padrão.

A partir desses resultados, optou-se pela utilização da faixa de 200 a 300 nm na construção do modelo de calibração multivariada para esse conjunto de amostras.

5.4.1.2 Seleção de Variáveis Latentes

O método de validação interna cruzada, excluindo uma amostra por vez, foi usado para determinar o número de variáveis latentes neste modelo de calibração e o mínimo PRESS foi obtido com duas variáveis latentes. Os erros de previsão em função do número de variáveis latentes são ilustrados na Figura 14.

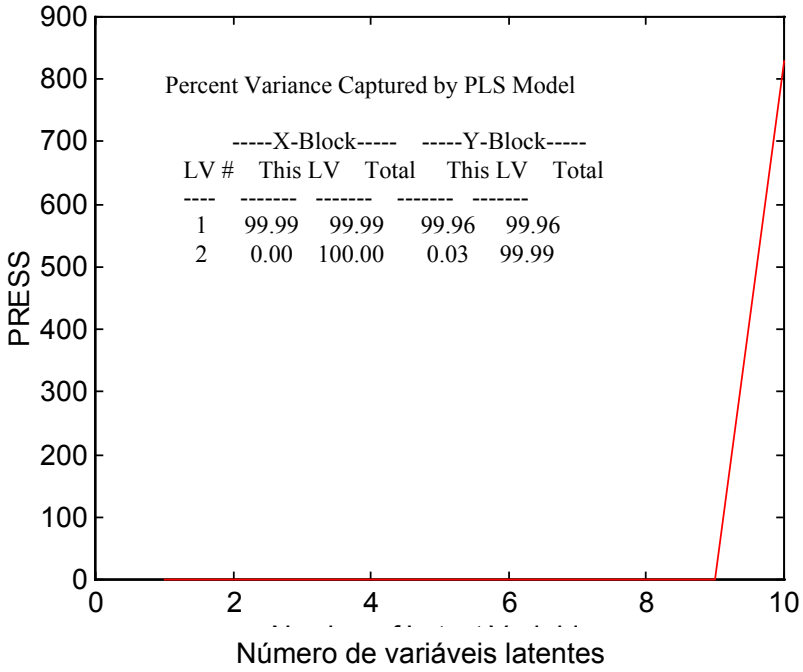


Figura 14. Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função do número de variáveis latentes obtidas por validação cruzada do conjunto de amostras padrão considerando a faixa espectral de 200 a 300 nm.

A inclusão da terceira variável latente nos modelos não diminui significativamente o PRESS em relação ao obtido com duas variáveis latentes. Neste modelo a primeira variável latente descreve 99,99% da variância na matriz X e 99,96% na matriz Y. A grande explicação da variância: 100% para X e 99,99% para Y, com duas variáveis latentes sugere que a inclusão da terceira variável

pode superestimar o modelo, tornando o modelo menos robusto e aumentando a chance de erro durante as determinação de AK em amostras desconhecidas,.

A análise dos coeficientes de regressão (Fig 15) a partir da decomposição das matrizes X por duas variáveis latentes mostra o número de pontos mapeados no espectro do AK e que serão considerados no momento de se preverem novas amostras. O gráfico mostra um desenho que lembra o espectro do AK, demonstrando uma monitoração de praticamente todo o comportamento espectral da molécula durante análises pelo modelo. Espera-se que quanto maior o número de coeficientes diferentes de zero, maior a sensibilidade do modelo.

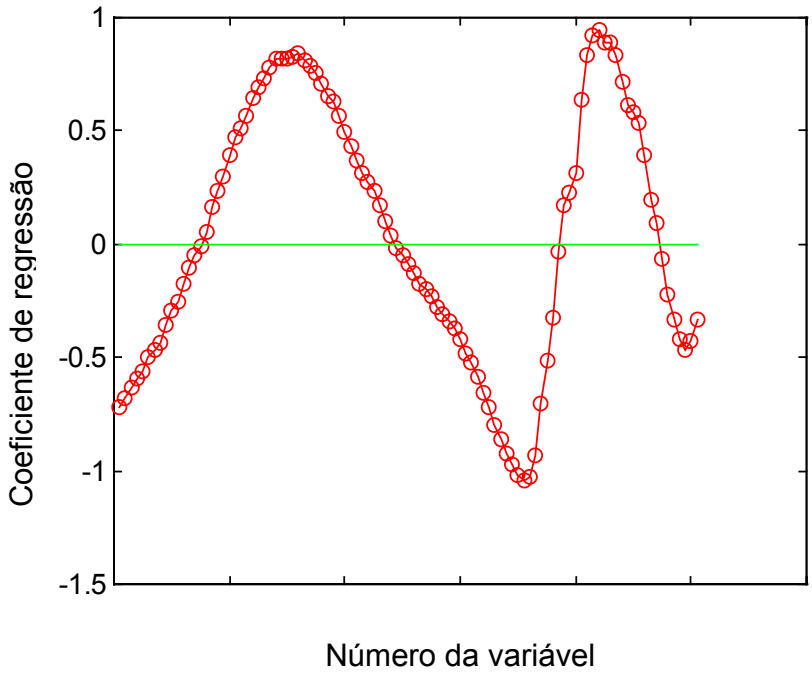


Figura 15. Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras padrão obtidos a partir de duas variáveis latentes.

5.4.1.3 Avaliação de anomalias

A observação de amostras anômalas, que poderiam influenciar negativamente o modelo, foi feita pela análise de influência (leverage) e resíduos de Student. A análise dessas grandezas demonstrou que nenhuma das amostras utilizadas na composição do modelo mostrou comportamento anômalo. Para os resíduos de Student são aceitos valores de erro inferiores ou iguais a 2,5% (nível de confiança de 95%) e de leverage iguais ou inferiores 0,6 (duas variáveis latentes em um modelo com 10 amostras). Neste conjunto de amostras, como pode ser visto da figura 16, observa-se um erro associado ao resíduo de student inferior a 1.5% e um leverage não superior a 0.5 para nenhuma das amostras.

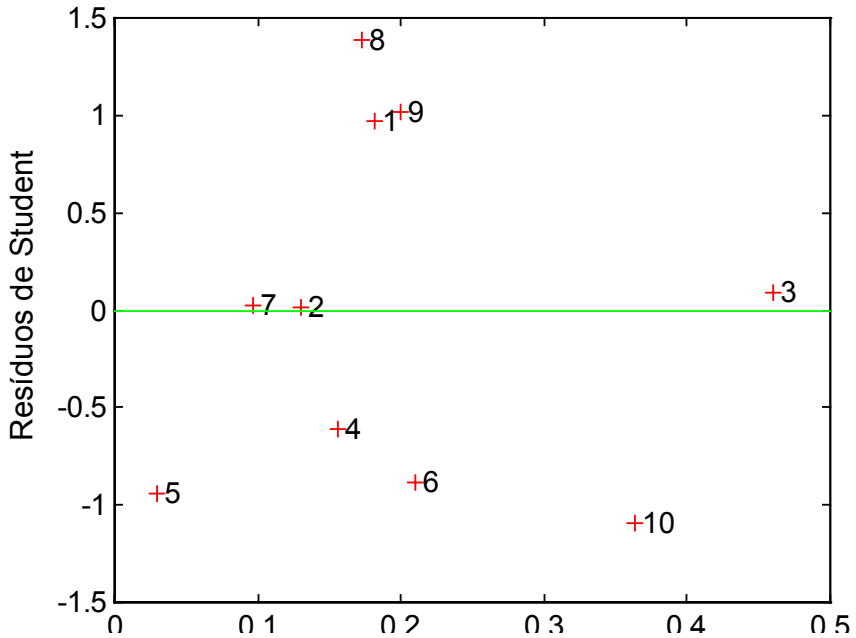


Figura 16. Análise de anomalias na construção do modelo de calibração a partir do leverage e resíduos de Student para o conjunto de amostras padrão.

5.4.1.4 Previsão de amostras padrão e creme

O modelo desenvolvido a partir das amostras padrão foi testado com relação à sua capacidade preditiva (previsão) das concentrações de AK no próprio conjunto de amostras padrão e no conjunto de amostras creme.

Os resultados da previsão pelo modelo das amostras padrão são mostrados na Tabela 10. Os resultados apresentaram um erro médio de previsão (MSEP) de 0,0065 e um valor da raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP) de 0,0808.

Tabela 10. Valores reais e encontrados das amostras padrão pelo modelo de calibração do conjunto de amostras padrão.

Valor Real (μg/ml)	Valor Encontrado (μg/ml)	Erro (%)
1,50	1,41	6,23
2,50	2,50	0,06
5,00	4,99	0,14
8,00	8,06	-0,75
10,00	10,10	-0,99
12,00	12,08	-0,70
15,00	15,00	0,01
20,00	19,87	0,67
25,00	24,90	0,39
30,00	30,09	-0,31

A linearidade entre os valores reais das amostras e encontrados foi avaliada pelo cálculo de coeficiente de correlação e coeficiente de determinação do conjunto de dados apresentando valores de r = 0,99996 e r^2 = 0,99992, respectivamente. Valores acima de 0,99 são considerados aceitáveis, o que demonstra excelente linearidade entre os valores reais e encontrados pelo modelo. A demonstração visual desses resultados é apresentado na Figura 17.

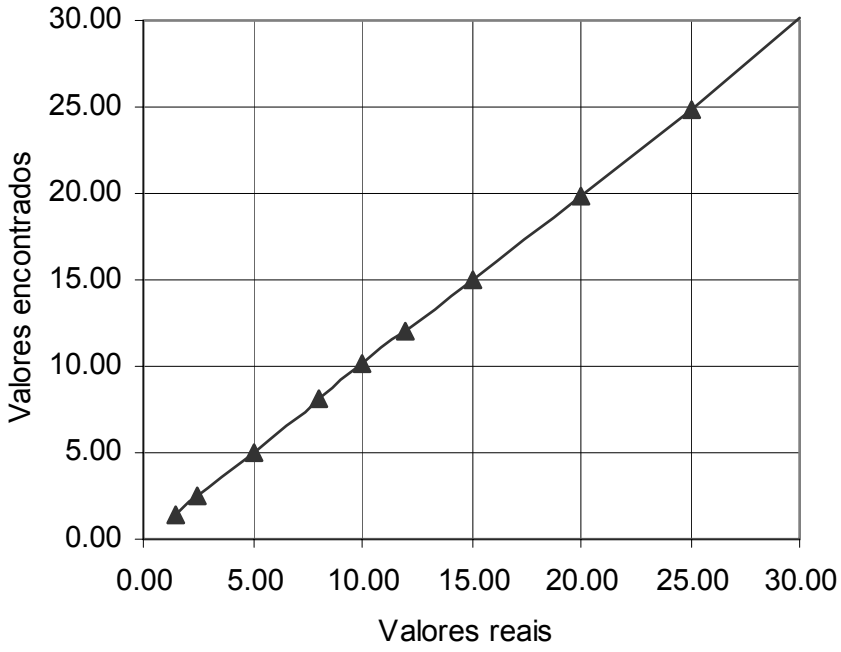


Figura 17. Gráfico dos valores reais e encontrados das amostras padrão pelo modelo de calibração construído a partir do conjunto de amostras padrão.

Os resultados de previsão das amostras creme a partir do modelo construído com amostras padrão estão apresentados na Tabela 11. Essa análise de previsão determina a capacidade preditiva desse modelo em quantificar o AK em amostras preparadas a partir de creme. Os resultados apresentaram um erro médio de previsão (MSEP) de 0,2444 e um valor de raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP) de 0,4944.

Tabela 11. Valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração do conjunto de amostras padrão.

Valores Reais (μg/ml)	Valores Encontrados (μg/ml)	Erro (%)
4,00	4,88	-21,92
8,00	8,49	-6,07
10,00	10,34	-3,35
12,00	12,01	-0,11
16,00	15,74	1,61
18,00	17,90	0,54
20,00	19,80	1,02
24,00	23,77	0,97
28,00	27,54	1,64
30,00	29,03	3,24

Os valores apresentados na tabela 11 mostram excelente linearidade, com coeficiente de correlação de 0,99977 e coeficiente de determinação de 0,99953. A demonstração visual desses resultados é apresentado na Figura 18.

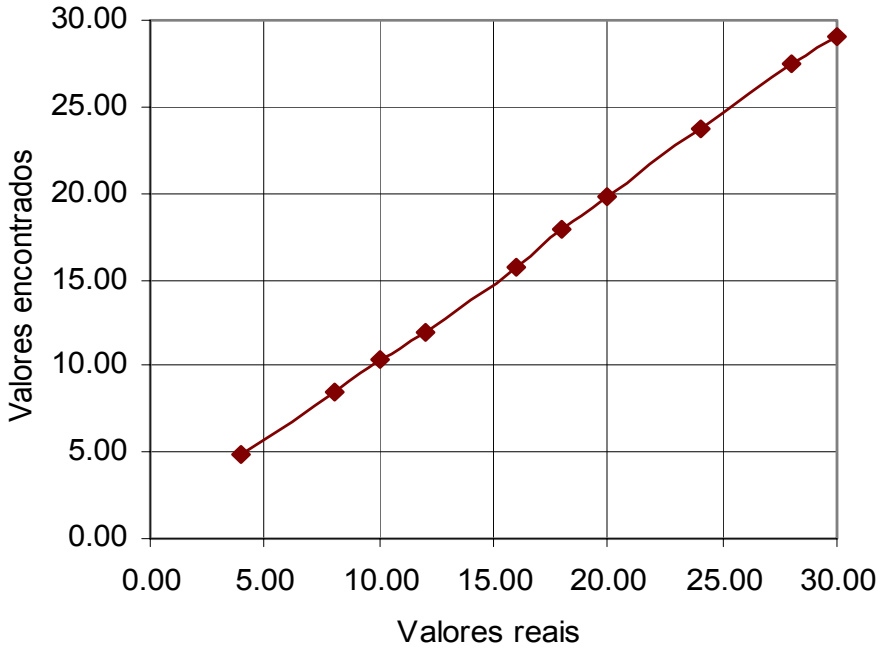


Figura 18. Gráfico dos valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração construído a partir do conjunto de amostras padrão.

5.4.2 Modelo a partir de amostras creme

O modelo construído a partir das amostras creme seguiu os mesmos passos descritos para as amostras padrão. Esses passos incluem a seleção da melhor faixa espectral, a determinação do número de variáveis latentes, a detecção de amostras anômalas e a avaliação da capacidade de previsão.

5.4.2.1 Seleção da Faixa Espectral

O coeficiente de determinação (r^2) calculado para cada comprimento de onda na faixa de 200 a 350 nm no conjunto de amostras creme mostrou resultados acima 0,99 na faixa de 207 a 305 nm, sendo os menores valores de 0,9912 em 207 nm e 0,9924 em 305 nm (Fig.19). O gráfico mostra que no intervalo de 250 a 290 nm encontram-se os valores mais próximos a 1,0. Pode-se observar também, da mesma forma que no conjunto de amostras padrão, uma queda pouco mais acentuada nos valores de r^2 próximos a 230 nm, condizente com o comportamento espectral do AK. Da mesma forma, acima de 305 nm, há uma queda acentuada do valor de r^2, devido à diminuição na absorção da substância nessa região.

A partir desses resultados, optou-se pela utilização da faixa de 207 a 305 nm na construção do modelo de calibração multivariada para o conjunto de amostras creme. A escolha se justifica pela excelente linearidade observada entre concentração de AK nas amostras e absorvância nessa faixa espectral.

Considerando os valores de r^2 muito próximos a 1,00 no intervalo de 250 a 290 nm, no entanto, foi construído também um modelo multivariado considerando somente essa faixa espectral mais restrita. A capacidade preditiva desse modelo adicional foi testada no conjunto de amostras creme a fim de se avaliar a influência da escolha da faixa espectral sobre esse aspecto.

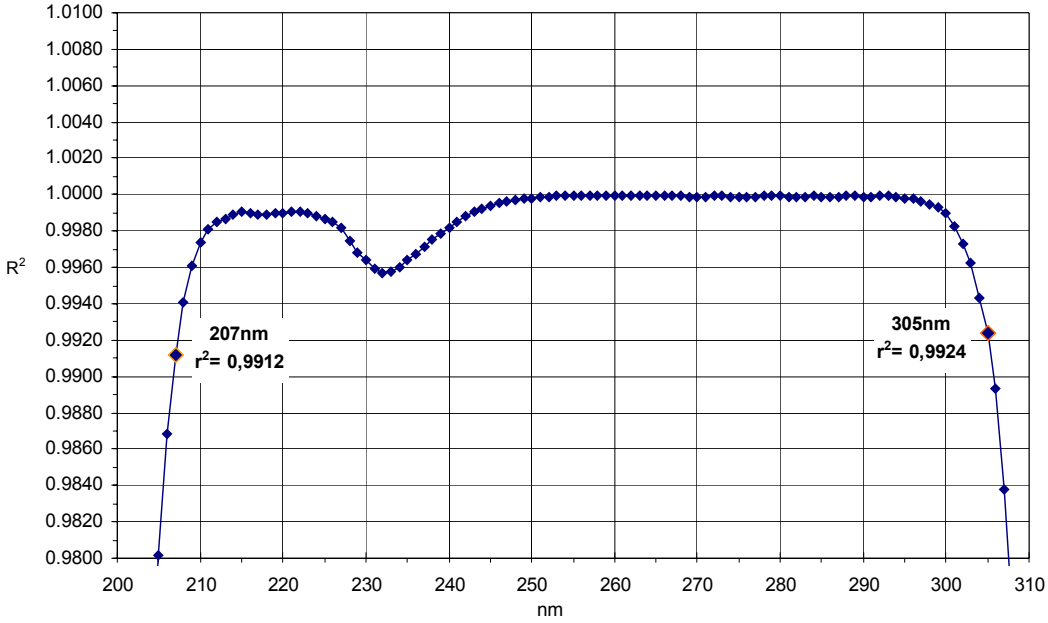


Figura 19. Espectro de correlação (r^2) para o conjunto de 10 amostras creme.

5.4.2.2 Seleção de Variáveis Latentes

O método de validação interna cruzada, excluindo uma amostra por vez, foi também usado para determinar o número de variáveis latentes no modelo de calibração a partir das amostras creme, sendo o mínimo PRESS obtido com duas variáveis latentes. Os erros de previsão em função do número de variáveis latentes são ilustrados na Figura 20.

A inclusão da terceira variável latente nos modelos não diminui significativamente o PRESS em relação ao obtido com duas variáveis latentes. Neste modelo a primeira variável latente descreve 99,95% da variância na matriz X e 99,93% na matriz Y. Com duas variáveis latentes é possível descrever 100%

da variância para X e 99,99% para Y. Isso sugere que a inclusão do terceiro fator pode superestimar o modelo no conjunto de amostras creme, de forma semelhante ao que ocorre no modelo construído a partir do conjunto de amostras padrão.

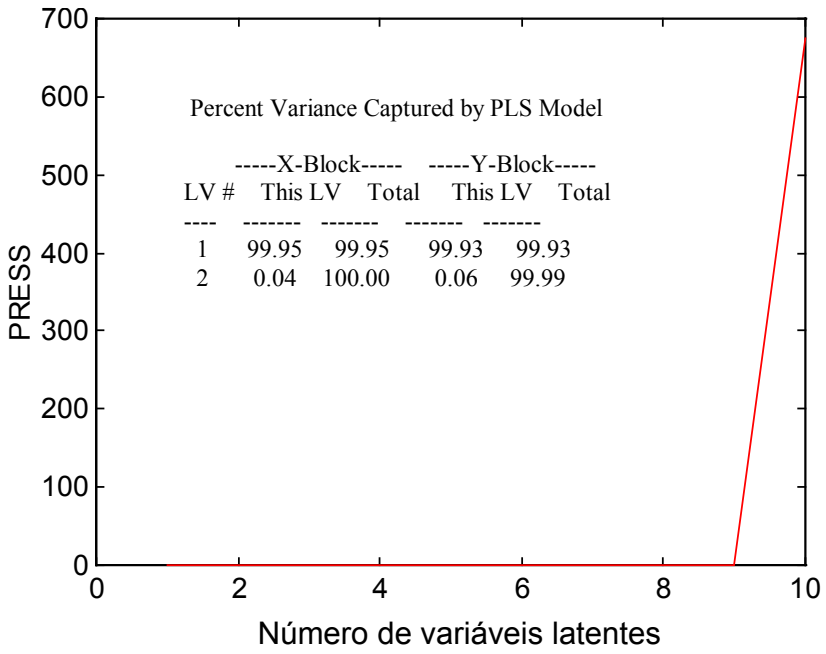


Figura 20. Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função no número de variáveis latentes obtidas por validação cruzada do conjunto de amostras creme considerando a faixa espectral de 207 a 305 nm.

Os coeficientes de regressão a partir da decomposição das matrizes X e Y por duas variáveis latentes encontram-se relacionados em função do número de pontos mapeados na Figura 21. O gráfico mostra um desenho menos semelhante ao espectro do AK que aquele observado para as amostras padrão. Esse comportamento gráfico pode ser explicado pela maior quantidade de interferentes nesse conjunto de amostras, mostrando a importância de se considerarem esses

interferentes no desenvolvimento do modelo multivariado. O gráfico mostra, ainda, a maior parte de seus valores de coeficientes de regressão diferentes de zero, fator este diretamente relacionado à especificidade do método.

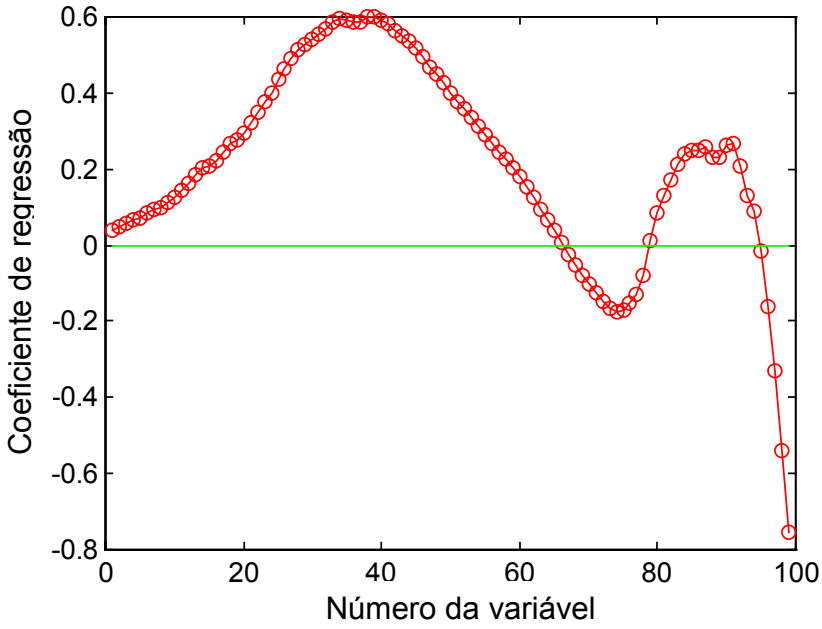


Figura 21. Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de duas variáveis latentes.

5.4.2.3 Avaliação de anomalias

A observação de amostras anômalas foi concluída para o conjunto de amostras creme pelos resíduos de Student e análise de influência (leverage). A análise dessas grandezas demonstrou que nenhuma dessas amostras utilizadas na composição do modelo mostrou comportamento anômalo (Fig. 22).

Em comparação ao conjunto de amostras padrão, esse conjunto mostrou erros ligeiramente superiores, próximos a 2% nos resíduos studentizados e a 0.6 no Leverage. Esses resultados encontram-se, no entanto, dentro dos valores aceitáveis, não produzindo prejuízos significativos ao modelo multivariado.

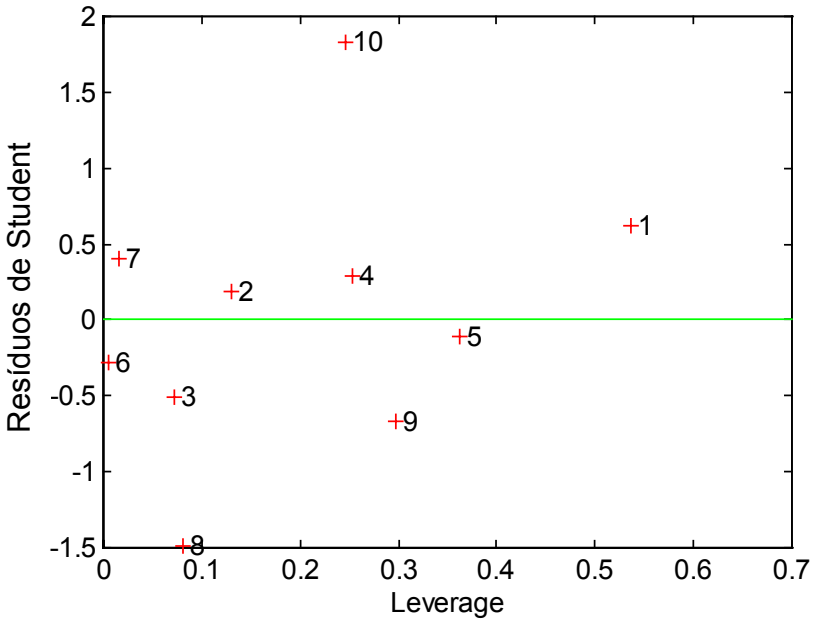


Figura 22. Análise de anomalias na construção do modelo de calibração a partir do leverage e resíduos de Student para o conjunto de amostras creme.

5.4.2.4 Previsão de amostras creme

Para o modelo desenvolvido a partir das amostras creme, foram feitas previsões no próprio conjunto de amostras creme, considerando que estas são as amostras de interesse no desenvolvimento do método.

Os resultados da previsão das amostras creme são mostrados na Tabela 12. Os resultados apresentaram um erro médio de previsão (MSEP) de 0,0052 e um valor de raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP) de 0,0719.

Tabela 12. Valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração do conjunto de amostras creme.

Valores Reais (μg/ml)	Valores Encontrados (μg/ml)	Erro (%)
4.00	3.96	1,02
8.00	7.98	0,21
10.00	10.05	-0,47
12.00	11.98	0,20
16.00	16.01	-0,05
18.00	18.03	-0,15
20.00	19.96	0,20
24.00	24.14	-0,57
28.00	28.05	-0,19
30.00	29.85	0,51

A linearidade entre os valores reais e encontrados foi também avaliada pelo cálculo de coeficiente de correlação com r = 0,99996 e coeficiente de determinação, com r^2 = 0,99992.

Os dados apresentados na tabela 12 apresentam linearidade muito próxima à obtida pelo modelo de amostras padrão, quando da determinação daquelas mesmas amostras. A demonstração visual desses resultados é apresentado na Figura 23.

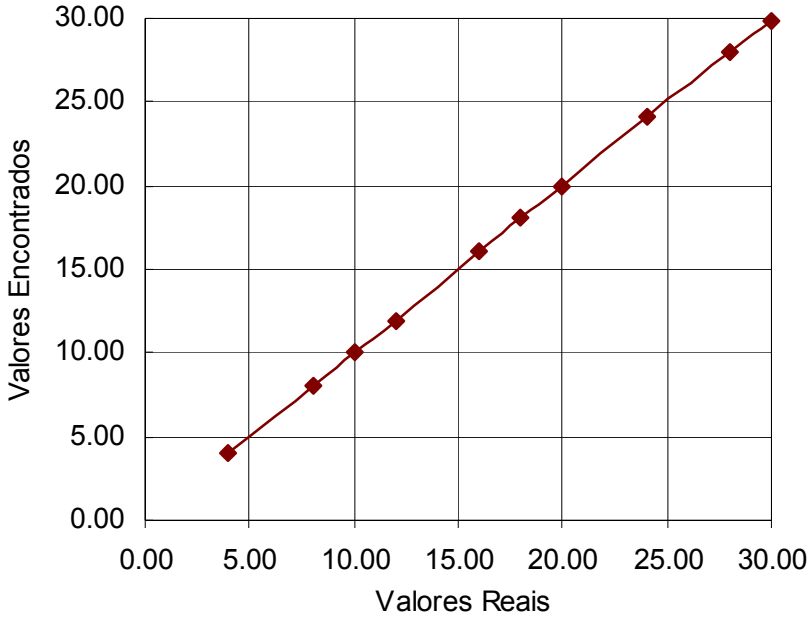


Figura 23. Gráfico dos valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração construído a partir do conjunto de amostras creme.

5.4.2.5 Modelo a partir de amostras creme utilizando outra faixa espectral

A faixa espectral entre 250 e 290 nm (41 comprimentos de onda) apresenta valores de r^2 muito próximos a 1,00, correspondendo a um área de intensa absorção do AK, com valores máximos de absorvância em 269 nm. Por essa característica, a construção de um modelo multivariado considerando dados dessa região do espectro pode gerar um método com maior especificidade e menor erro de previsão.

Como pode ser visto na figura 24, o modelo multivariado construído nessa faixa espectral, utilizando validação interna cruzada e excluindo uma amostra por vez, apresenta um PRESS bastante próximo a zero considerando-se até 6 variáveis latentes. A primeira variável latente é capaz de explicar 100% da

variância na matriz X e 99,99% da variância na matriz Y. Observa-se, ainda, que 2 variáveis latentes são suficientes para explicar 100% da variância nas matrizes X e Y. Isso indica que a adição de uma terceira variável poderá superestimar ainda mais o modelo, reduzindo sua robustez e, conseqüentemente, sua capacidade preditiva.

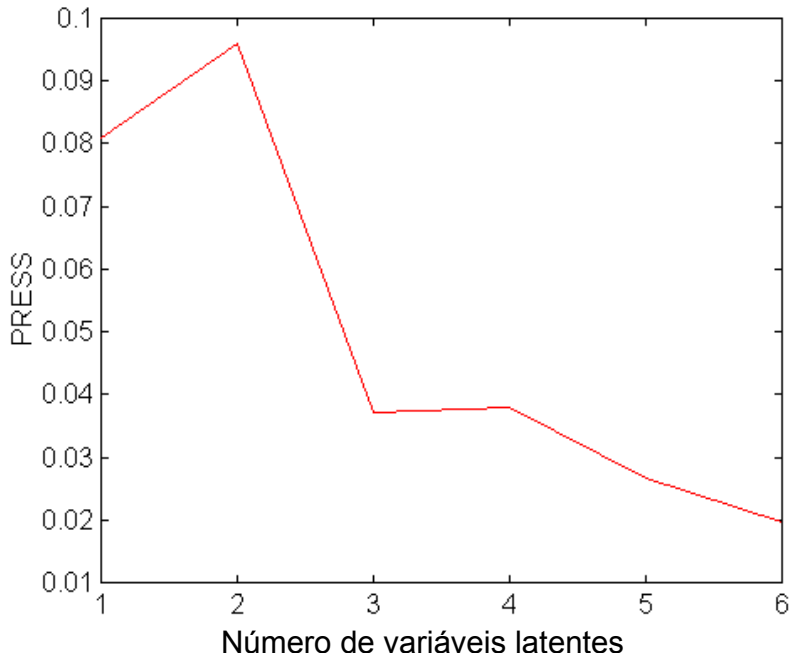


Figura 24. Soma dos quadrados do erro de previsão PRESS em função no número de variáveis latentes obtidas por validação cruzada do conjunto de amostras creme considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm.

Considerando na construção deste modelo somente a primeira variável latente (VL1), obtém um gráfico de coeficientes de regressão bastante semelhante ao próprio comportamento espectral do AK na faixa de 250 a 290 nm, conforme pode ser observado na figura 25. No gráfico é possível observar a inexistência de

coeficientes de regressão de valores iguais a zero, indicando que toda a variação contida na matriz X (comportamento espectral do AK) está sendo monitorada.

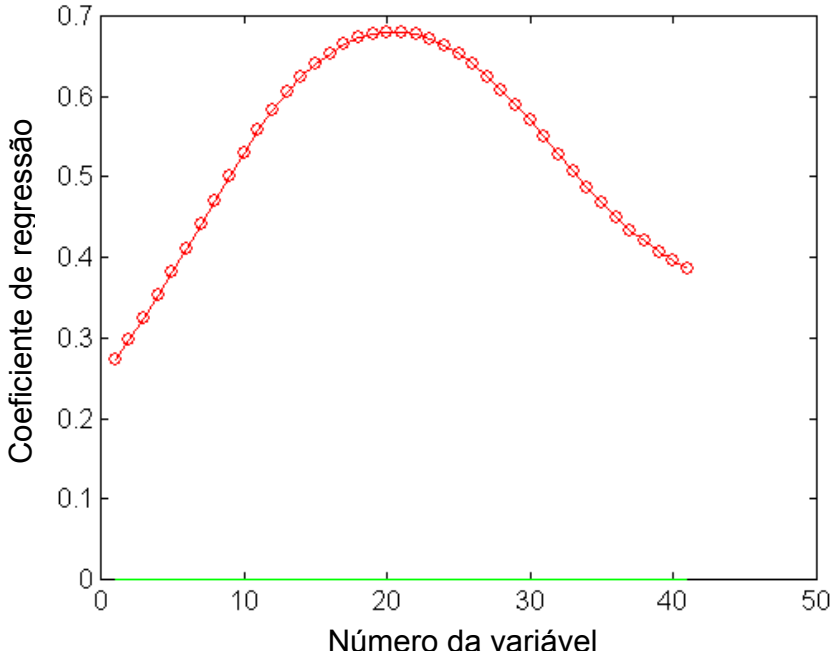


Figura 25. Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de uma variável latente, no intervalo de 250 a 290 nm.

Para este conjunto de calibração (amostras creme), considerando somente a primeira variável latente, não são encontradas amostras de comportamento anômalo, conforme mostram os resultados de resíduos de Student e Leverage na figura 26. Para este modelo são desejáveis valores de resíduos inferiores a 2,5% e de leverage inferiores a 0,3 (uma variável latente em dez amostras). No conjunto de calibração a amostra 10 apresenta o maior valor de leverage e as amostras 10 e 1, os maiores valores de resíduos de Student. Os valores de erro encontrados, no entanto, estão todos dentro dos limites permitidos.

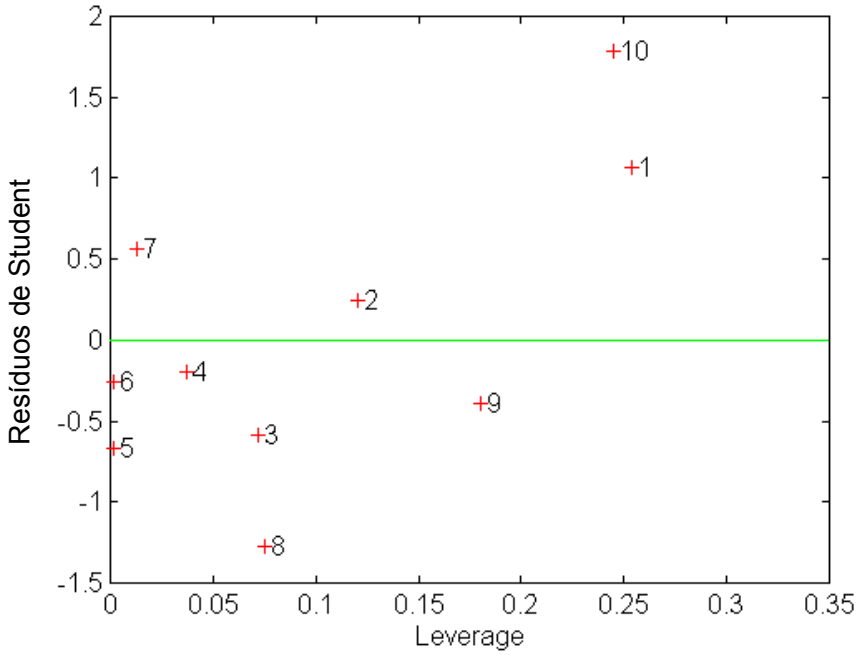


Figura 26. Análise de anomalias a partir do leverage e resíduos de Student na construção do modelo de calibração para o conjunto de amostras creme, considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm e uma variável latente.

A capacidade preditiva deste modelo, avaliada para as amostras creme de AK, apresenta valores de MSEP = 0,0055 e RMSEP = 0,741. O teste F apresenta um resultado de 0,99990, demonstrado que os valores reais e encontrados pelo modelo estão bastante próximos. A análise de regressão simples dos valores reais e encontrados demonstra excelente linearidade entre eles, com r = 0,99996 e r^2 = 0,99992. Estes resultados pouco diferem daqueles observados considerado toda a faixa espectral de 207 a 305 nm nesse conjunto de amostras.

Os valores reais de AK das amostras creme e aqueles encontrados pelo modelo multivariado construído considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm estão na tabela 13.

Tabela 13. Valores reais e encontrados das amostras creme pelo modelo de calibração do conjunto de amostras creme, considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm e uma variável latente.

Valores Reais (μg/ml)	Valores Encontrados (μg/ml)	Erro (%)
4.00	3.91	2,18
8.00	7.98	0,28
10.00	10.05	-0,53
12.00	12.02	-0,15
16.00	16.06	-0,40
18.00	18.02	-0,13
20.00	19.95	0,27
24.00	24.12	-0,48
28.00	28.03	-0,12
30.00	29.85	0,49

O modelo construído, a partir da faixa espectral de 250 a 290 nm, considerando 2 variáveis latentes, mostra alguns resultados bastante distintos daquele que considera somente 1 variável latente, a começar pela análise de coeficientes de regressão (Fig 27). A figura mostra um desenho bastante diferente daquele apresentado pelo AK nessa região do espectro. Isso pode ser explicado pelo fato de duas variáveis latentes explicarem 100% da variância tanto na matriz X como na matriz Y, o que leva à monitorização de toda informação obtida do conjunto de calibração.

Modelos de calibração multivariada construídos sob essas características geralmente são menos robustos e apresentam valores de erro de previsão mais elevados quando da determinação de amostras de concentração desconhecida. Isso ocorre porque informações desnecessárias da matriz X podem estar sendo monitoradas.

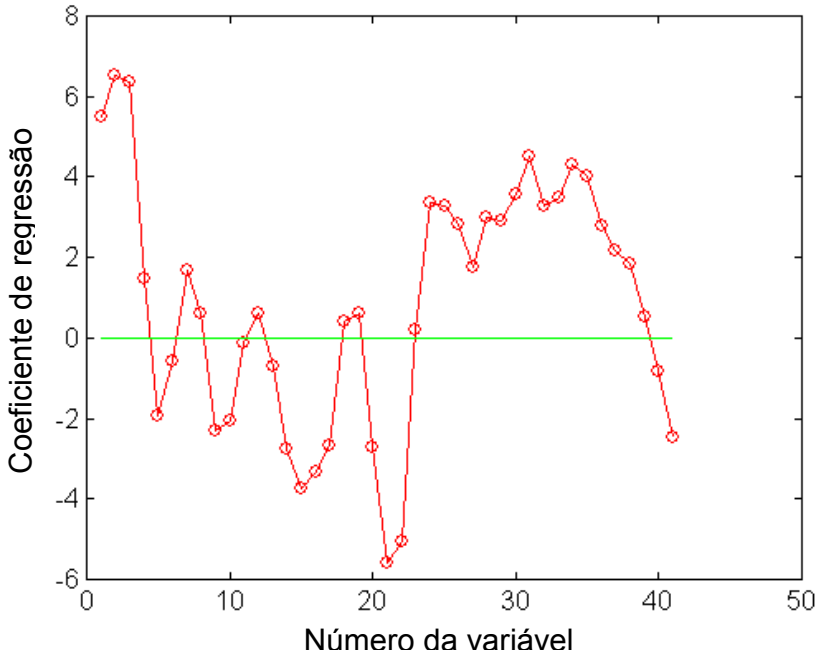


Figura 27. Coeficientes de regressão em função no número de variáveis analisadas no conjunto de calibração amostras creme obtidos a partir de duas variáveis latentes, no intervalo de 250 a 290 nm.

Utilizando duas variáveis latentes nesse conjunto de calibração espera-se que nenhuma amostra apresente valores de resíduos de student maiores que 2,5% e leverage maior que 0,6. A figura 28 mostra os resultados de student e leverage para as 10 amostras analisadas a partir de duas variáveis latentes, no intervalo de 250 a 290 nm. Pode observar que a amostra número 10, apesar de apresentar um resíduo próximo a zero, possui um valor de leverage muito alto, acima de 0,8. Isso indica que essa amostra, sob essas condições, tem um comportamento distinto das demais o que poderia influenciar negativamente a capacidade preditiva do modelo.

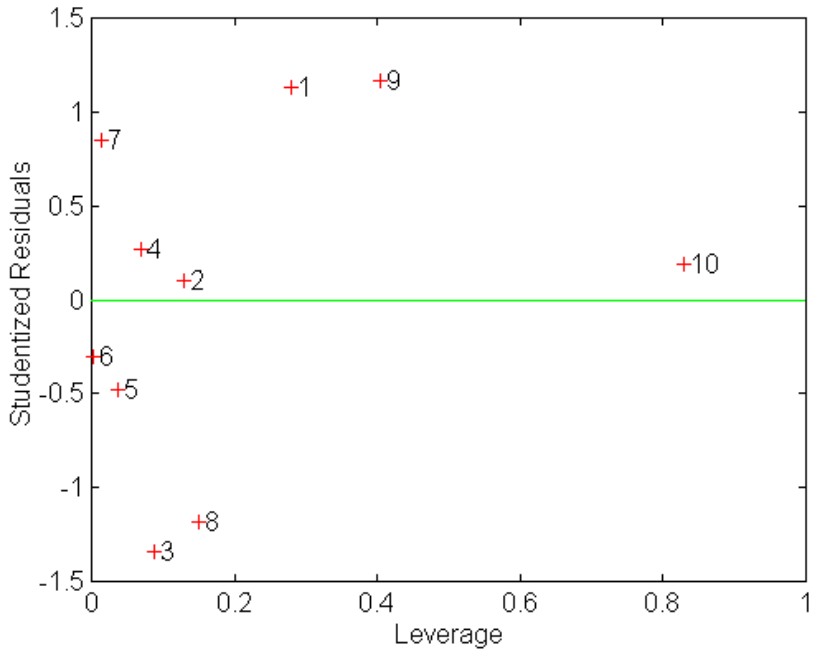


Figura 28. Análise de anomalias na construção do modelo de calibração a partir do leverage e resíduos de Student para o conjunto de amostras creme, considerando a faixa espectral de 250 a 290 nm e duas variáveis latentes.

Os resultados obtidos no conjunto de amostras creme, testando diferentes faixas espectrais e alternando o número de variáveis latentes, não variam consideravelmente. A escolha da faixa espectral de 250 a 290 nm, utilizando apenas uma variável latente, não reduz de forma significativa o erro de previsão calculado para as amostras creme e apresenta uma amostra de comportamento anômalo quando considera duas variáveis latentes. Considerando esses dados, manteve-se a utilização da faixa espectral de 207 a 305 nm para o conjunto de amostras creme.

5.4.3 Comparação dos modelos de calibração

Um resumo comparativo das análises dos modelos de calibração construídos a partir dos conjuntos de amostras padrão e creme é mostrado na Tabela 13. O modelo construído a partir das amostras creme apresentado corresponde à utilização da faixa espectral de 207 a 305 nm.

Tabela 14. Comparação entre os modelos multivariados a partir das amostras padrão e creme na previsão das amostras creme.

Parâmetro	Modelo a partir de amostras padrão	Modelo a partir de amostras creme
MSEP	0.2444	0.0052
RMSEP	0.4944	0.0719
Teste F	0.8663	0.9999

Os resultados de MSEP, RMSEP e F apontam para um melhor desempenho do modelo a partir das amostras creme. Isso pode ser atribuído ao fato das amostras creme conterem em sua matriz componentes do veículo que podem atuar como interferentes. Quando esses componentes são considerados no processo de calibração, obtém-se um modelo mais específico e menos sujeito a erros de determinação. Isso demonstra que a matriz onde está contida a substância de interesse deve ser considerada no desenvolvimento de um modelo multivariado. O modelo construído a partir de amostras padrão, por não considerar esses componentes, mostra-se menos capaz de superar as interferências e de identificar com maior exatidão o AK nas amostras creme.

A partir dessas análises, optou-se pela utilização do modelo multivariado construído a partir das amostras teste creme e serão apresentados os resultados da validação desse modelo.

5.5 VALIDAÇÃO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO

5.5.1 Exatidão

A exatidão do modelo multivariado foi avaliada por ensaio de recuperação, em que quantidades conhecidas de AK padrão foram adicionadas ao veículo e então determinado seu teor. Segundo critérios da ANVISA (2002) são aceitos valores de recuperação entre 98 e 102% do valor esperado.

O método multivariado de determinação do AK mostrou-se exato, considerando os valores de recuperação apresentados: 98,29%, 98,55% e 98,43% para as três amostras analisadas, respectivamente; valores estes que se encontram dentro dos limites aceitos pela ANVISA (2003) e ICH (1996). Os valores de coeficiente de variação (CV) foram inferiores a 2% em todas as análises (Tab.15).

Tabela 15. Resultados do teor de ácido kójico no ensaio de recuperação pelo método multivariado.

	Amostra 1% de AK	Amostra 2% de AK	Amostra 3% de AK
Valores encontrados (µg/ml)	19,58	19,90	14,86
	19,48	19,37	14,52
	19,91	19,86	14,92
CV (%)	1,14	1,51	1,48
Média (µg/ml)	19,66	19,71	14,77
Valor esperado (µg/ml)	20,00	20,00	15,00
Porcentagem de recuperação	98,29%	98,55%	98,43%

No preparo das amostras, quantidades adequadas de creme contendo ácido kójico foram transferidas quantitativamente para balões de 500 ml de modo a se obterem soluções finais de 100, 200 e 300 µg/ml para os cremes a 1%, 2% e 3%, respectivamente. Essas soluções foram filtradas em filtro qualitativo e diluídas em triplicata obtendo-se soluções finais de AK com 20 µg/ml (cremes 1% e 2%) e 15 µg/ml (creme 3%).

5.5.2 Especificidade

O sistema em que se encontra o AK pode ser considerado um sistema pouco complexo, em que a quase totalidade dos componentes apresenta baixa absorção no ultravioleta, em comparação ao fármaco. Essa baixa absorção pode ser observada na Figura 12 (p. 72), que mostra os espectros obtidos a partir das amostras creme e inclui o comportamento espectral do veículo sem AK na área mais basal do gráfico. O método convencional de quantificação do AK, validado por GOMARA et al. (2004), apresenta como limitação a interferência do conservante metilparabeno que, por absorver na mesma região do espectro que o AK, faz com que sejam superestimadas as concentrações de analito nas amostras do produto acabado (forma farmacêutica com AK incorporado).

Dessa forma, fez-se necessário avaliar a especificidade do método multivariado quanto à sua capacidade de superar a presença de substâncias com essas características. Essa avaliação foi realizada comparando-se o método multivariado com a espectrometria convencional (univariada), pela determinação de AK em amostras de creme contendo conservantes.

Para determinação do teor de AK pelo método convencional (GOMARA *et al*.,2004) foi construída uma curva padrão, apresentada na figura 29. Os valores de absorvância utilizados na construção da curva foram obtidos a partir de soluções aquosas contendo AK preparadas em três dias consecutivos e lidas em triplicata (n=9). Os resultados de absorvância mostraram desvio padrão médio de 0,0261 e um coeficiente de variação médio de 2,3%.

A análise de regressão linear dos valores obteve um coeficiente de correlação (r) de 0,99999 e um coeficiente de determinação (r^2) de 0,99998 indicando excelente relação linear entre as amostras analisadas (valores de x) e os resultados de absorvância (valores de y). O coeficiente angular, que expressa a

inclinação da curva, foi calculado em 0,05822 e o coeficiente linear, que expressa a intersecção da curva ao eixo y, em 0,00460. A equação da reta obtida foi x= (0,00460 - y)/0,05822, onde x corresponde à concentração de ácido kójico procurada e y o valor a absorvância da amostra.

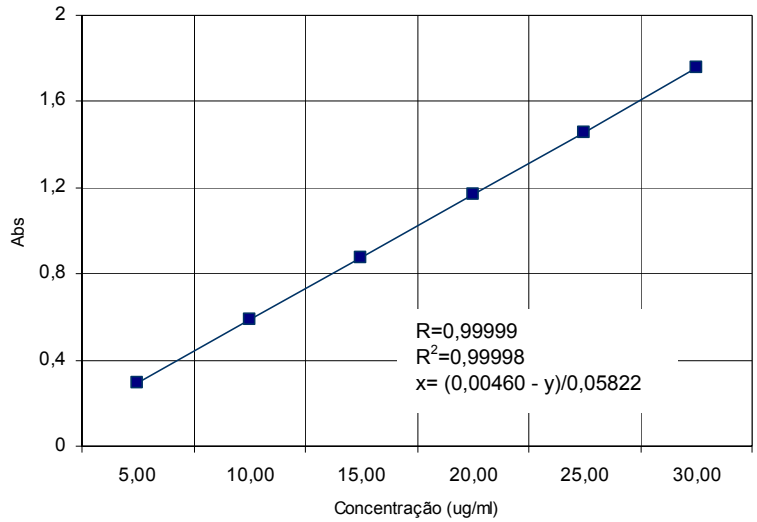


Figura 29. Curva padrão de soluções aquosas de ácido kójico padrão por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (leitura em 269nm).

Os resultados comparativos da determinação do teor de AK em amostras de creme pelos métodos espectrométricos convencional e multivariado são apresentados na tabela 16.

Para o método convencional, as porcentagens de recuperação se mantiveram acima de 100% para todas as amostras, sendo de 101,2%, 101,3% e 102,5% para os cremes contendo 1%, 2% e 3% de AK, respectivamente. O valor de recuperação da amostra de creme de maior concentração mostrou-se fora dos

limites aceitáveis para ensaio de recuperação segundo as normas da ANVISA (2002) e ICH (1996).

Tabela 16. Porcentagens de recuperação de ácido kójico em amostras de creme por espectrometria multivariada e convencional.

	Amostra 1% de AK	Amostra 2% de AK	Amostra 3% de AK
Método Multivariado	98,29%	98,55%	98,43%
Método Convencional	101,2%	101,3%	102,5%

Para o modelo multivariado, todos os resultados mantiveram-se dentro dos limites desejados. Comparando-se os dois métodos, pode-se dizer que o método multivariado apresenta boa especificidade para o AK e é capaz de superar a presença de excipientes. Essa constitui uma característica importante dessa técnica de calibração, na medida em que incorpora às leituras instrumentais as informações geradas por possíveis interferentes.

5.5.3 Linearidade e Intervalo

Os resultados referentes à linearidade do modelo multivariado são apresentados em detalhe no tópico 5.4.2.4 (p.84). Os resultados para o coeficiente de correlação foram de 0,99996 e para o coeficiente de determinação de 0,99992, demonstrando que o modelo multivariado para determinação do AK é linear no intervalo de 4 a 30 ug/ml. São considerados aceitáveis para análise da linearidade valores de coeficiente de correlação iguais ou acima de 0,99 (ANVISA, 2003).

5.5.4 Precisão

As análises de precisão concluídas foram a repetibilidade (intra-corrida) e precisão intermediária (inter-corridas). A reprodutibilidade do método não foi

analisada tendo em vista a não disponibilidade da realização de medidas interlaboratoriais.

Os resultados do ensaio de repetibilidade mostram um coeficiente de variação inferior a 1%, valor bastante abaixo da variação máxima aceita para este teste (5%). Para cada diluição foram preparadas três soluções e as leituras foram feitas em triplicata, gerando 9 resultados para cada concentração. A Tabela 17 mostra as médias de previsão pelo modelo para cada solução preparada em cada diluição, a média final de previsão obtida, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela 17. Resultados da determinação de ácido kójico em creme pelo modelo multivariado no ensaio de repetibilidade (intra-corrida).

Concentração	16 ug/ml	20 ug/ml	24 ug/ml
	15.72	19.92	23.80
Resultados	15.83	19.87	23.97
	15.66	19.77	23.85
Média	15.74	19.85	23.88
DP	0,09	0,08	0,09
CV(%)	0.55	0.38	0.38

O ensaio de precisão intermediária foi concluído para o modelo multivariado sendo realizado em dois dias diferentes (separados por 48 horas), por dois analistas diferentes, no mesmo laboratório e mesmos equipamentos.

Os resultados obtidos mostram-se bastante próximos para as duas experimentações, com um coeficiente de variação máximo inferior a 1%. Estes valores também se encontram abaixo do máximo permitido para este teste (5%) sendo considerados, portanto, aceitáveis. A Tabela 18 mostra as médias dos valores previstos pelo modelo multivariado nos dois dias de análise, a média final obtida, o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Tabela 18. Resultados determinação de ácido kójico em creme pelo modelo multivariado no ensaio de precisão intermediária (inter-corridas).

Concentração	16 ug/ml	20 ug/ml	24 ug/ml
Resultados Dia 1	15.67	19.98	23.76
	15.65	19.66	23.89
	15.66	19.66	23.92
Resultados Dia 2	15.73	19.59	23.58
	15.68	19.46	23.87
	15.66	19.54	23.54
Média	15.69	19.53	23.66
DP	0,03	0,18	0,16
CV(%)	0.20	0.32	0.75

A análise final dos resultados dos ensaios de repetibilidade e precisão intermediária permite afirmar que o método espectrofotométrico por calibração multivariada para determinação do AK apresenta-se preciso, tanto para análises intra-corrida como inter-corridas.

5.5.5 Robustez

A resistência (ou sensibilidade) do método multivariado a variações externas nas condições experimentais ou das amostras constitui um fator a se determinar tão importante quanto as avaliações dos erros de previsão (SWIERENGA *et al*., 1999). A análise da robustez determinará as condições próprias em que deve ser desenvolvida a calibração e os fatores que devem ser levados em conta durante a construção do modelo. Neste trabalho, os parâmetros de robustez do método multivariado avaliados foram a influência da temperatura, do tempo de leitura e do pH. Considerando que a etapa crítica do modelamento constitui a obtenção dos espectros do analito de interesse, neste caso o AK, a principal observação a ser feita é a influência de alterações das condições experimentais ou ambientais no comportamento espectral da solução contendo o analito. Isto considerando que eventuais alterações neste comportamento podem alterar os resultados da calibração e conseqüentemente os resultados de

previsão, podendo gerar erros significativos de determinação. As limitações nesses casos poderão ser atribuídas à técnica espectrofotométrica, e não propriamente ao modelo multivariado.

Existem diversas circunstâncias capazes de introduzir variações espectrais que poderiam não estar incluídas na etapa de calibração. Essencialmente, três situações podem tornar um método inválido: 1) Alterações físico-químicas na constituição das amostras, 2) Mudanças na função da resposta instrumental e 3) variações nas condições ambientais de medida instrumental. Especificamente nesta última, variações de temperatura e umidade podem produzir intensa influência nos valores medidos, causando alterações de bandas de absorção ou não linearidade em áreas determinadas do espectro (FEUDALE et al., 2002).

5.5.5.1 Influência da Temperatura

O comportamento espectral das solução contendo AK 20 µg/ml, incluída no conjunto de amostras creme foi observado em diferentes temperaturas. As soluções foram lidas nas temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25 e 35 °C. Os espectros resultantes são apresentados na Figura 30 e mostram uma superposição significativa dos valores de absorvância em toda faixa de 200 a 330 nm. O desvio padrão médio de absorvância obtido foi 0,017 mostrando que o AK na solução analisada se mostra bastante estável à variação de temperatura. No comprimento de onda característico da molécula, 269 nm, a absorção média foi de 1,235 (DP=0,024, CV=1,98%). Submetendo-se os espectros obtidos à determinação pelo modelo multivariado sob análise, obtiveram-se resultados próximos ao esperado, porém com coeficiente de variação de 2,4% e erro médio de 3,38% (DP=2,48), conforme pode ser observado na tabela 19.

Tabela 19. Resultados da determinação de ácido kójico em amostra creme em diferentes temperaturas de obtenção dos espectros.

	Temperatura (°C)						CV (%)
	5	10	15	20	25	35	
Resultado esperado (µg/ml)	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	0,00
Resultado previsto (µg/ml)	20,60	20,79	20,87	21,27	19,96	20,20	2,4%
Erro (%)	4.82	3.97	4.33	6.37	-0.20	0.99	-

As porcentagens de erro observadas superiores a 2% indicam limitação na capacidade preditiva do método multivariado quando a temperatura das amostras difere muito daquela presente no conjunto amostral de calibração. Isso se confirma ao se observar que o menor erro (-0,20%) encontra-se em 25°C. Esta temperatura provavelmente seja a mais próxima da temperatura real em que as amostras creme do conjunto de calibração foram lidas e por isso apresenta-se dentro do erro desejável (inferior a 2%). Na temperatura de 35°C foi observado também um erro inferior a 1%.

Dessa forma, apesar de alterações de temperatura influenciarem pouco o comportamento espectral do AK em solução, essa influência é suficiente para elevar o erro de determinação do método multivariado calibrado neste experimento a índices não aceitáveis. Uma estratégia possível de superação dessa limitação pode ser a inclusão no conjunto de calibração de amostras com variações pré-concebidas, de modo a calibrar essas variações e preparar o modelo a superá-las. Outro caminho, conforme sugerido por SWIERENGA *et al*. (1999), pode ser a construção de vários modelos de calibração PLS usando diferentes técnicas de processamentos dos dados e números de fatores (variáveis

latentes). Expondo esses diversos modelos às condições de robustez adequadas, pode-se optar por aquele que apresente menor erro de previsão e maior robustez.

O método espectrométrico por calibração multivariada para determinação do AK, conforme indicam os dados, deve ser construído sob condições de temperatura que se reproduzam, ou possam reproduzir, no momento da análise de novas amostras de concentração desconhecida. Caso aconteçam variações de temperatura significativas, o modelo deverá ser atualizado sob essas novas condições.

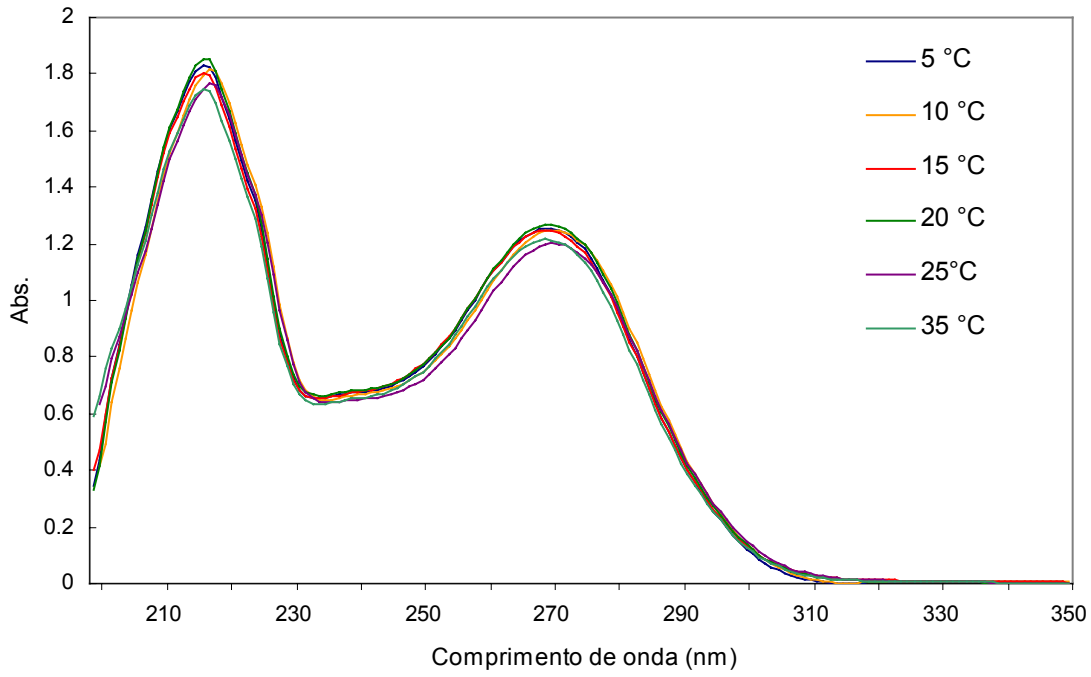


Figura 30. Comportamento espectral de solução contendo ácido kójico (20 µg/ml) em diferentes temperaturas.

5.5.5.2 Influência do Tempo de Leitura

A estabilidade da absorção do AK foi avaliada em função do tempo de leitura após o preparo das amostras. O espectro de uma solução de AK 18 µg/ml foi lido no tempo 0, logo após seu preparo, e nos tempos de 2, 5 e 24 horas depois. Os espectros resultantes são apresentados da Figura 31 que mostra, de forma semelhante ao que ocorre em diferentes temperaturas, uma superposição significativa dos valores de absorvância em toda faixa de 200 a 330 nm. Neste caso, o desvio padrão médio de absorção obtido foi 0,016 mostrando que o AK na solução analisada se mostra bastante estável ao longo do tempo analisado. Em 269 nm, a absorção média foi de 1,094 (DP=0,005, CV=0,45%). Na região do espectro entre 200 e 250 nm, pode-se observar uma maior variação de absorção no tempo de 24h, o que poderia alterar os resultados quando da determinação desse espectro pelo modelo calibrado. Submetendo os espectros ao modelo, no entanto, se obtiveram valores muito próximos ao valor esperado (18 µg/ml), com erro inferior a 1%, conforme apresentado da Tabela 20

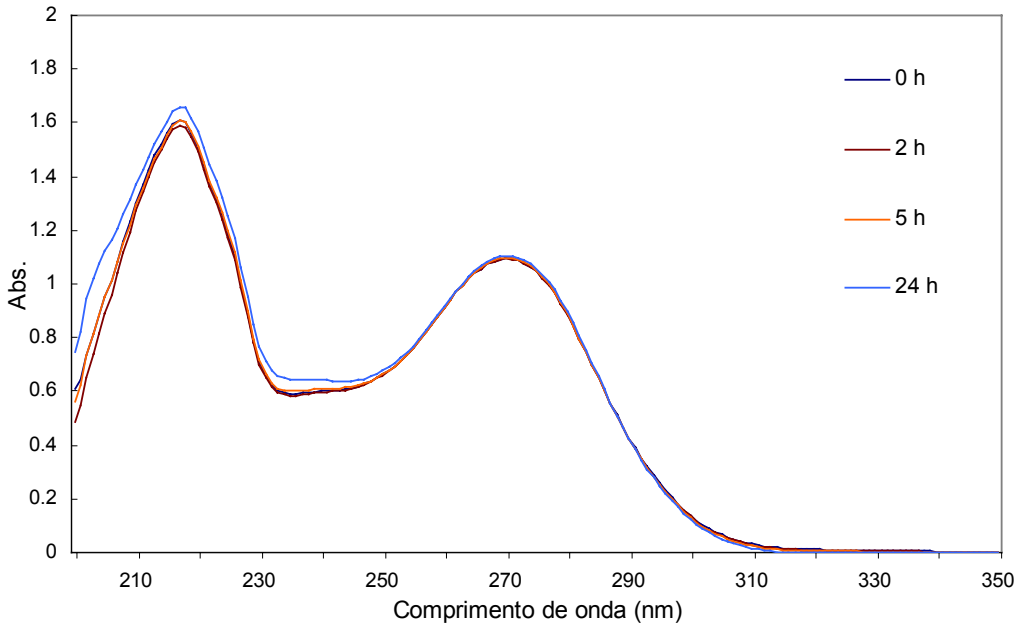


Figura 31. Comportamento espectral de solução contendo ácido kójico (18 µg/ml) em diferentes tempos de leitura.

Os resultados confirmam a estabilidade do AK ao longo desse tempo, em que produtos de degradação que absorvam significativamente na faixa de 200 a 350 nm aparentemente não são formados na amostra analisada.

Tabela 20. Resultados da determinação de ácido kójico pelo método multivariado em amostra creme a partir de diferentes tempos de leitura.

Tempo (horas)	0	2	5	24	CV (%)
Resultado esperado (µg/ml)	18,00	18,00	18,00	18,00	0,00
Resultado previsto (µg/ml)	18,03	18,04	18,04	18,09	0,17
Erro (%)	0,15	0,21	0,21	0,52	-

Estes dados permitem a afirmação de que o tempo de leitura não constitui fator limitante do método espectrofotométrico por calibração multivariada, dando-se a leitura das amostras num tempo de até 24 horas após seu preparo. O método espectrofotométrico multivariado apresenta-se robusto no que se refere ao tempo de leitura das amostras.

5.5.5.3 Influência do pH

O comportamento espectral do AK em solução 20 µg/ml mais veículo em diferentes valores de pH, e sua influência nos erros de previsão pelo modelo multivariado foram observados conforme mostrado na Figura 32.

Pode-se observar uma mudança significativa no espectro a partir de pH = 7,0. Em pH alcalino, à medida que há aumento dos valores de pH, observa-se um deslocamento batocrômico de modo que a absorção ao redor de 269 nm, máxima em condições normais, tende a diminuir e uma nova região de intensa absorção surge entre 310 e 320 nm. Na faixa entre 210 e 220 nm ocorre uma alteração distinta. Em pH alcalino, há uma intensificação acentuada da absorção dessa região cromófora com deslocamento da absorvância máxima para entre 220 e 230 nm.

O AK apresenta pK_a de 7,09 e 8,03, próximo ao pKa do Fenol que é 8,2 (BUDAVARI, 1996). A partir desse dado, uma possível explicação, conforme já apontado por GOMARA (2003), para o deslocamento observado em pH básico seria a ionização da hidroxila enólica da molécula, resultando num arranjo eletrônico distinto da forma não ionizada e, portanto, com espectros de absorção diferentes.

Em pH ácido, por outro lado, o AK mostra um aspecto espectral bastante estável. Em pH 2 e pH 5,5 as áreas de absorção características da molécula continuam inalteradas e não parecem sofrer alteração significativa. Durante este

trabalho, os valores de pH mantiveram-se ao redor de 6,4, faixa abaixo do valor de pKa, em que alterações de absorção não são observadas. Este pH médio encontra-se acima daquele relatado em experimentos anteriores (GOMARA, 2003) que estiveram entre 5,0 e 6,0. Essa diferença, no entanto, é esperada, dado a inclusão de veículo na composição das soluções, o que faz com que o pH final suba.

No que diz respeito ao método multivariado, pode-se esperar que este sofra influência significativa do pH quando este se encontra acima de 7,0. Este resultado, como aponta FEUDALE et al., constitui uma limitação prática da calibração multivariada que ocorre quando um modelo existente é aplicado para espectros obtidos sob novas condições físico-químicas, ambientais ou em um novo equipamento.

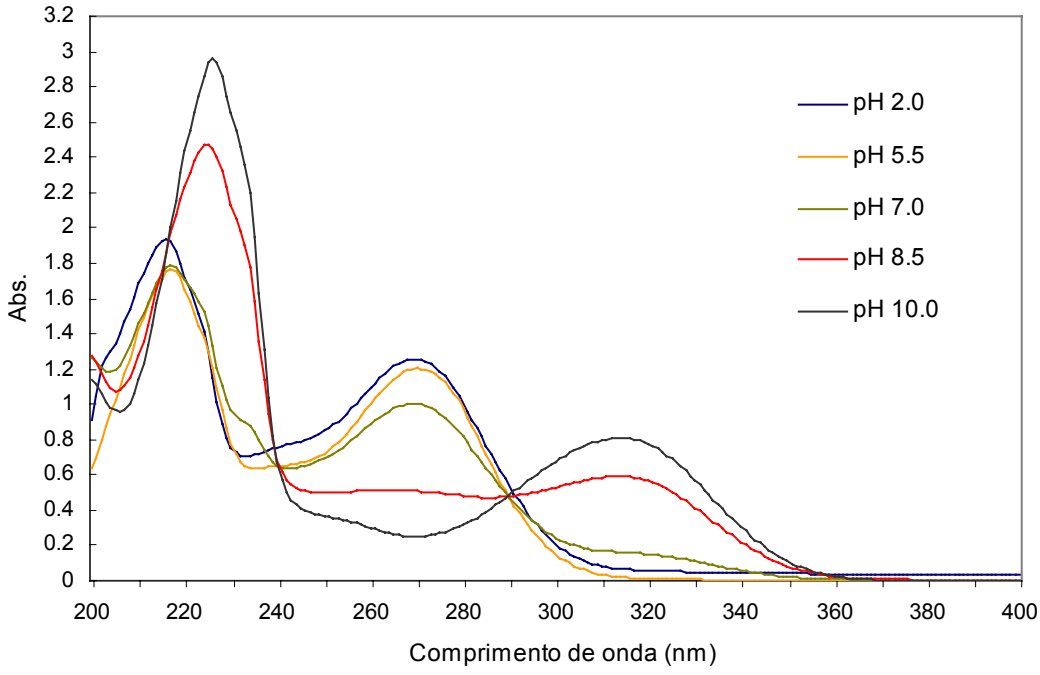


Figura 32. Comportamento espectral de soluções contendo ácido kójico (20 µg/ml) em diferentes valores de pH.

Dessa forma, é recomendável controlar o pH para valores abaixo de 7,0 quando se deseja trabalhar com essa metodologia. Considerando o caráter ácido do AK e o caráter neutro dos diferentes veículos usados em sua forma farmacêutica, pode-se esperar que soluções preparadas com esses materiais se mantenham em pH levemente ácido, sem alteração do comportamento espectral. É recomendável, no entanto, que se mantenham essas mesmas condições experimentais no preparo de amostras desconhecidas que serão analisadas pelo método multivariado. A característica de "calibração" desse método exige que as condições das amostras que compõem o conjunto de calibração sejam as mesmas das amostras desconhecidas que serão posteriormente analisadas. Caso contrário, poderá haver aumento do erro de previsão.

Outra possibilidade de superação dessa limitação consiste na transferência ou atualização do modelo às diferentes condições apresentadas, o que significa, preparar um novo conjunto de calibração (nas novas condições) e proceder novamente cada uma das etapas de construção do modelo.

Com relação à influência do pH, portanto, pode-se afirmar que o método espectrofotométrico multivariado é sensível a alterações de pH, devendo-se atentar para que o pH das amostras do conjunto de calibração seja semelhante ao das amostras de concentração desconhecida que serão determinadas.

5.6 Comparação com outros métodos validados

Outros dois métodos validados para determinação do AK foram a espectrofotometria convencional no ultravioleta (GOMARA *et al.*, 2004) e a partir da complexação do AK com cloreto férrico (GOMARA, 2003), com deslocamento espectral para a região do visível. Tendo-se em conta os parâmetros avaliados por estes autores na validação desses métodos, a Tabela 21 traz uma análise comparativa desses resultados com o método multivariado.

Comparando-se os resultados, a capacidade de superação da interferência de componentes da matriz surge como uma diferença entre o método multivariado e o convencional. O método de complexação com cloreto férrico mostra-se mais específico, porém menos sensível do que o método convencional. Considerando as características do método multivariado, não foi possível determinar a sensibilidade a partir do coeficiente angular da curva padrão, pois o mesmo não possui uma curva padrão convencional. A curva obtida dos valores reais e previstos das amostras teste fornece um coeficiente angular de 0,99992, porém este valor não pode ser comparado com aqueles dos métodos espectrométricos convencionais, que possuem uma curva de calibração.

Tabela 21. Comparação entre os métodos de quantificação do ácido kójico.

Método / Parâmetros	ULTRAVIOLETA[1]	CLORETO FÉRRICO[2]	CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA
Interferência do metilparabeno	SIM	NÃO	NÃO
Sensibilidade[3]	0,06244	0,008331	Não avaliada
Linearidade e intervalo (µg/ml)	5 – 30	5 – 60	4 – 30
Influência do pH	SIM	SIM	SIM
Influência do tempo de leitura	NÃO	NÃO	NÃO
Influência da temperatura	NÃO	NÃO	SIM
Exatidão	SIM	SIM	SIM
Precisão intra-corrida	SIM	SIM	SIM
Precisão inter-corridas	SIM	SIM	SIM

[1] GOMARA et al., 2004. [2] GOMARA, 2003. [3] Sensibilidade obtida pelo coeficiente angular da curva padrão.

Comparando-se a robustez, observa-se que os métodos convencionais sofrem menos influência da temperatura em comparação ao modelo multivariado.

Essa diferença de robustez, no entanto, pode ser superada atualizando-se o conjunto de calibração e o modelo construído às condições de temperatura desejadas. Como já discutido anteriormente, é necessário que as condições de análise de amostras desconhecidas sejam consideradas na construção do modelo, de modo que sejam as mesmas ou o mais semelhantes possível.

De modo geral, pode-se considerar que o método por calibração multivariada para determinação do AK atende aos requisitos necessários tanto quanto os métodos convencionais apresentados, apresentando como principal vantagem uma maior especificidade com relação ao ultravioleta e como limitações as condições experimentais em que o modelo é construído e as amostras desconhecidas são analisadas.

Os três métodos se mostram adequados, sendo que a escolha de um deles dependerá do sistema ou forma farmacêutica em que o ativo encontre-se presente, sua concentração e a disponibilidade ou não dos componentes da forma farmacêutica, como o veículo base e o princípio ativo.

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados observados e discutidos neste trabalho é possível concluir que:

- O ácido kójico é um fármaco freqüentemente prescrito para uso tópico isolado e em associação com outros agentes clareadores, em média na concentração de 2%;

- As associações mais prescritas encontradas foram ácido kójico com ácido glicólico, ácido kójico com ácido retinóico e ácido kójico com hidroquinona e ácido glicólico.

- O método por calibração multivariada, construído a partir de amostras contendo excipientes, apresenta-se adequado para determinação do ácido kójico em forma farmacêutica de uso tópico;

- O método é linear no intervalo de 4 a 30 ug/ml e mostra-se exato e preciso (repetibilidade e precisão intermediária), com margens de erro e variação dentro das especificações apresentadas por entidades nacionais e internacionais;

- O modelo multivariado mostra elevada especificidade, em comparação ao método espectrofotométrico convencional, sendo capaz de superar a presença de interferentes, quando os mesmos são incluídos na construção do modelo.

- O tempo decorrido do preparo da amostra à obtenção do espectro não influencia a capacidade preditiva do método multivariado, num período de até 24 horas.

- Variações nas características físico-químicas das amostras, notadamente temperatura e pH, tem influência direta sobre a capacidade preditiva do método desenvolvido neste trabalho, aumentando circunstancialmente a margem de erro e inviabilizando as determinações;

REFERÊNCIAS

A.D.A.M., Inc. **Enciclopedia médica en español: Melanina**. ADAM medical illustration team, 2002. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/9620.htm> Acesso em 14 Abr. 2004.

AHN, K.S. *et al.* Downregulation of NF-kB activation in human keratinocytes by melanogenic inhibitors. **J Dermatol Sci**, v.31, p.193-201, 2003.

ANVISA. Resolução n°899 de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 02 fev. 2003.

ARNOLD, H.L. ODOM, R.B. JAMES, W.D. A pele: estrutura básica e função. In: _____. **Doenças da Pele de Andrews: Dertamotologia Clínica**. 8ª Ed. São Paulo: Manole: 1994ª, p.1-14.

ARNOLD, H.L. ODOM, R.B. JAMES, W.D. Distúrbios da Pigmentação. In: _____. **Doenças da Pele de Andrews: Dertamotologia Clínica**. 8ª Ed. São Paulo: Manole: 1994b, p.1063-1080.

ARNSTEIN, H.R.V. BENTLEY, R. The biosynthesis of kojic acid 3. The incorporation of labelled small molecules into kojic acid. **Biochemistry**, v.54, p.517-522, 1953.

AZULAY, R.D. AZULAY, D.R. A Pele: Embriologia, estrutura e Fisiologia. In: _____. **Dermatologia**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999a, p.2-14.

AZULAY, R.D. AZULAY, D.R. Discromias. In: _____. **Dermatologia**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999b, p.54-62.

BAJPAI, P. AGRAWAL, P.K. VISHWANATHAN, L. Kojic acid: Synthesis and properties. **J Sci Ind Res**, v.41, p.185-194, 1982.

BEEBE, K.R. KOWALSKI, B.R. An introduction to multivariate calibration and analysis. **Anal Chem**, v.59, p.1007A-1017A, 1987.

BUDAVARI, S.(org). **The Merck Index**, 12th edition, Merck & Co., Inc., 1996

BURDOCK, G.A. SONI, M.G. CARABIN. I.G. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.33, p.80–101, 2001.

CABANES, J. CHAZARRA, S. CARMONA, F.G. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. **J Pharm Pharmacol**, v.46, n.12, p.982-985, 1994.

CHASIN, A.A.M. et al. Validação de métodos analíticos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev Bras Toxicol**, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

COSCIONE, A.R. O uso de calibração multivariada para determinação espectrofotométrica simultânea de alumínio e ferro: aplicação na análise de plantas e solos. Campinas, jun. 2001. [Tese de doutorado] Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

COTELESSA, C. *et al*. The use of chemical peelings in the treatment of different cutaneous hyperpigmentations. **Dermatol Surg**, v.25, n.6, p.450-454, 1999.

DOWNING, D. CLARK, J. Estatística aplicada. São Paulo: Ed. Saraiva, 1999.

DURAKOVA, Z. BETINA, V. NEMEC, P. Systematic analysis of mycotoxins by thin-layer chromatography. **J Chromatogr**, v.116, p.141-154, 1976.

ELLIS, D.A.F. TAN, A.K.W. How wee do it: Management of facial hyperpigmentation. **The Journal of Otolaryngology**, v.26, n.4, p.286-289, 1997.

FERIOLI, V. *et al*. New combined treatment of hypermelanosis: analytical studies on efficacy and stability improvement. **Inter J Cosmetic Sci**, v.23, p.333-340, 2001.

FERREIRA, M.M.C. *et al*. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v.22, n.5, set./out. 1999.

FEUDALE, R.N. et al. Transfer of multivariate calibration models: a review. **Chemo Intel Lab Systems**, v.64, p.181-192, 2002.

FRISVAD, J. THRANE, U. Standardized high-perfomance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolities based on alkylphenone retention indexes and UV-VIS spectra (diode arrays detection). **J Chromatogr**, v.40, p.195-214, 1987.

GOICOECHEA, H.C. OLIVIERI, A.C. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in tablet preparations by multivariate spectrophotometric calibration. **J Pharm Biomed Analysis**, v.20, p. 681-686, 1999.

GOMARA, F.L. Estudo de permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. Curitiba, jun. 2003. [Dissertação de Mestrado]. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná - UFPR.

GOMARA, F.L. et al. Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de ácido kójico. **Ars Pharm** v. 45, n.2, p.145-153, 2004.

GOMES, A.J. *et al.* The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Braz J Med Biol Res**, v.34, p.1487-1494, 2001.

HAN, R. *et al*. Redefining the skin´s pigmentary system with a novel tyrosinase assay. **Pigment Cell Res**, v.15, p.290-297, 2002.

HERMANNS J.F. *et al*. Assessment of topical hypopigmenting agents on solar lentigines fo Asian women. **Dermatology**, v.204, p.281-286, 2002.

HUIPRASERT, P. The bleaching effect of the combination kojic acid and glycolic acid versus the glycolic acid for the treatment of melasma. **Thai J Dermatol**, v.17, n.1, p.37-40, 2001.

ICH. Note for Guidance on Validation of Analytical Methods; Methodology., 29 nov. 1995.

ICH. Guidance for Industry. Q2B - Validation of analytical procedures: Methodology. International Conference on Harmonization, 06 nov. 1996.

KAKITA, L.S. LOWE, N.J. Azelaic acid and glycolic acid combination therapy for facial hiperpigmentation in darker-skinned patients, a clinical comparison with hidroquinone. **Clin Ther**, v.20, p.960-970, 1998.

KATSAMBAS, A. STEFANAKI, C. Disorders of Pigmentation: Unapproved Treatments. **Clinics in Dermatology**, v.20, p.649-659, 2002.

KITADA, M. FUKIMBARA, T. Kojic acid fermentation.VII. Mechanism of the conversion] of glucose to kojic acid. **Hakko Kogaku Zasshi**, v.49, p.847-851, 1971.

KONZEN, P.H.A. *et al*. Otimização de métodos de controle de qualidade de fármacos usando algoritmo genético e busca tabu. **Pesquisa Operacional**, v.23, n.1, p.189-207, 2003.

LEITE, F. Validação em análise química. 4ª Ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2002.

LIM, J.T.E. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatol Surg**, v.25, n.4, p.282.-284, 1999.

LIMA, S.L.T. Seleção de variáveis em calibração multivariada a partir da hessiana dos erros. Campinas, nov. 2000. [Dissertação de Mestrado]. Mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP..

MARTOS, N.R. *et al*. Simultaneous spectrofluorimetric determination of (acetyl)salicylic acid, codeine and pyridoxine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration. **J Pharm Biomed Anal**, v.23, p.837-844, 2000.

MASSART, D.L. *et al*. **Chemometrics: A Textbook**. Amsterdan: Elsevier, 1988.

MESSERSCHMIDT, I. Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de refletância e calibração multivariada. Campinas, 1999. [Tese de doutorado] Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

MILLLER, C.E. The use of chemometrics techniques in process analytical method development and operation. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.30, p.11-22, 1995.

NAKAGAWA, M. KAWAI, K. KAWAI, K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. **Contact Dermatitis**, v.32, p.9-13, 1995.

NEPOTE, A.J. DAMIANI, P.C. OLIVIERI, A.C. Chemometrics assisted spectroscopic determination of vitamin B6, vitamin B12 and dexamethasone in injectables. **J Pharm Biomed Anal**, v.31, p.621-627, 2003.

NOHYNEK, G.J. *et al*. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.93-105, 2004.

OLIVEIRA, F.C.C. *et al*. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Química Nova**, v.27, n.2, p.218-225, 2004.

ORDIZ, I. Melanina y agentes despigmentantes. **Revista de Medicina Estética**, n.10, ago-set, 2003. Disponível em: <http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n10/melanina.htm> Acesso em 07/01/2004.

OWENS, R.G. WELTY, R.E. LUCAS, G.B. Gas-chromatography analysis of the mycotoxins kojic acid, terreic acid and terrein. **Anal Biochem**, v.35, p.249-258, 1970.

PETIT, L. PIERARD, G.E. Skin-lightening products revisited. **Inter J Cosmetic Sci**, v.25, p.169-181, 2003.

ROSFARIZAN, M. MADIHAH, S. ARIFF, A.B. Isolation of a kojic acid-producing fungus capable of using starch as a carbon source. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.27-30, 1998.

SAITO, K. Uber die saurebildung bei aspergillus oryzae. Japão: **J Botany**, v.21, p.7-11, 1907.

SALES, F. CALLAO, M.P. RIUS, F.X. Multivariate standardization techniques using UV-Vis data. **Chemo Intell Lab Systems**, v.38, p.63-73, 1997.

SAMPAIO, S.A.P. RIVITTI, E.A. Pele Normal: Anatomia e Fisiologia. In: _____. **Dermatologia**. 1ª Ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998a, p.4-35.

SAMPAIO, S.A.P. RIVITTI, E.A. Discromias. In: _____. **Dermatologia**. 1ª Ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998b, p.267-283.

SANCHEZ, N.P. *et al*. Melasma: a clinical, light microscopic, ultrastructural, and immunofluorescence study. **J Am Acad Dermatol**. v.4, n.6, p.698-710, 1981.

SCARMINIO, I.S. *et al*. Calibração multivariada para sistemas com bandas sobrepostas através da análise de fatores do tipo Q. **Química Nova**, v.21, n.5, p.590-596, 1998.

SEIBERG, M. *et al*. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. **Exp Cell Res**, v.254, p.25-32, 2000.

SENA, M.M. POPPI, R.J. N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine. **J Pharm Bio Analysis**, v.34, p.27-34, 2004.

SENA, M.M. *et al*. Aplicação de métodos quimiométricos na especiação de Cr(VI) em solução aquosa. **Química Nova**, v.24, n.3, p.331-338, 2001.

SOUZA, K.V. de, PERALTA-ZAMORA, P. Spectrophotometry determination of phenol in the presence of congeners by multivariated calibration. **An Acad Bras Cienc**, v.73, n.4, p.519-5524, 2001.

SWIERENGA, H. *et al*. Strategy for constructing robust multivariate calibration models. **Chemo Intell Lab System**s, v.49, p.1-17, 1999.

TANIGAKI, H. OBATA, H. TOKUYAMA, T. The determination of kojic acid using the stopped-flow method. **Bull Chem Soc Jpn**, v.35, p.3195-3197, 1980.

THOMAS, E.V. A primer on multivariate calibration. **Anal Chem**, v.66, p.795A-804A, 1994.

TRIOLA, M.F. Elementary statistics. 6ª Ed. New York: Addison-Wesley Publishing Company, 1995.

UTHER, M et al. Kojic acid and its derivatives in cosmetics and health protection. **Parfuem Kosmet**, v.74, p.554-556, 1993.

VIRADOR, V.M. *et al*. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v.270, p.207-219, 1999.

WOLD, H. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. **Technometrics**, v.20, p.397-405, 1978.

YOON, T. *et al*. Reconstituted 3-dimensional human skin of various ethnic origins as an in vitro model for studies of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v.318, p.260-269, 2003.

ANEXO 1. **Modelo de protocolo de pesquisa utilizado junto às farmácias magistrais.**

CARACTERÍSTICAS DAS PRESCRIÇÕES DE FORMULAÇÕES MAGISTRAIS CONTENDO AGENTES CLAREADORES DE USO TÓPICO

Prezada colaboradora: Obrigado por aceitar participar da nossa pesquisa. As informações sobre como proceder com a coleta dos dados encontram-se abaixo. Se houver qualquer dúvida, pedimos que entre em contato conosco.

Pesquisadores:

Farmacêutico Cassyano J. Correr
Prof. Dr. Roberto Pontarolo (orientador)

Antecedentes

Estamos trabalhando em uma pesquisa registrada no departamento de farmácia da UFPR, na área de controle de qualidade, em que procuramos o desenvolvimento e validação de um método analítico eficiente de quantificação do ácido kójico em formulações magistrais dermatológicas. Para isso, porém, precisamos saber a freqüência com que o ácido kójico é prescrito, se comparado com outros agentes clareadores, e quais as concentrações e associações mais usadas.

Objetivo Geral:

Conhecer as características qualitativas e quantitativas das receitas contendo agentes clareadores de uso tópico aviadas em farmácias de manipulação em Curitiba-PR.

Objetivos específicos:

- Levantar quantas receitas foram manipuladas contendo na formulação um ou mais dos seguintes agentes despigmentantes/clareadores: ácido kójico, ácido glicólico, hidroquinona, ácido retinóico ou ácido fítico.

- Conhecer a freqüência com que os agentes citados acima são prescritos, de forma isolada na formulação ou em associação.

- Conhecer as associações mais freqüentes de agentes clareadores prescritas e as concentrações de princípios ativos mais usadas.

Coleta das informações pelo pesquisador colaborador:

1) Fazer o levantamento de todas as formulações de uso tópico (dermatológicas) que contenha um ou mais dos seguintes ativos: ácido kójico, ácido glicólico, hidroquinona, ácido retinóico ou ácido fítico manipuladas em sua farmácia no período de tempo indicado abaixo.
2) O levantamento deverá ser feito considerando o movimento dos meses de Maio, Junho, Julho e Agosto de 2003. Isso representará um movimento de 4 meses da farmácia no ano.
3) O levantamento poderá ser realizado pelo pesquisador de acordo com o modo como os dados são registrados em sua farmácia. Algumas farmácias dispõem de registro eletrônico (software-sistema computacional), outras dispõem de registro em papel (livro de registro).

4) O levantamento poderá ser feito diretamente pela farmacêutica ou por auxiliar designado por ela (isso fica a critério de cada farmácia).
5) Junto com estas instruções, você está recebendo um disquete contendo a tabela do word que será preenchida com os dados coletados na sua farmácia.
6) Os dados que deverão ser coletados de cada formulação levantada serão os seguintes:
    a. Princípios ativos clareadores da formulação (nome genérico e concentração);
    b. Outros princípios ativos não clareadores presentes (nome genérico e concentração);
    c. Veículo utilizado (base), incluindo o nome do veículo e sua formulação completa (componentes e concentração)[4];

Segue abaixo um exemplo de formulação levantada:

Formulação	Quantidade formulada			
	Mai/03	*Jun/03*	*Jul/03*	*Ago/03*
Ácido kójico 2% *Hidroquinona 4%* *Gel creme com base emulsionante não iônica – Emulgade wax ® q.s.p.* *Emulgade wax 15%* *Natrosol 0,5%* *Nipagin 0,2%* *Triglicerideo ácido cáprico 10%* *Propilenoglicol 8%* *Água destilada q.s.p.* *BHT 0,2%* *EDTA 0,2 %* (emulgade wax – associação álcool cetoestearílico etoxilado, estarato de sorbitano e monooleato de sorbitano etoxilado -20 OE-)	02	04	04	01

Obs. A composição das bases utilizadas podem ser descritas no final da tabela, a fim de facilitar o trabalho, e tendo em vista que o número de bases é limitado.

Entrega dos dados coletados

A tabela do Word (ou os relatórios da farmácia) contendo os dados do levantamento poderão ser entregues a um dos membros da equipe principal da pesquisa até final de janeiro de 2004. O arquivo do Word pode ser enviado por e-mail para cassyanocorrer@hotmail.com. Caso queira entregar pessoalmente ligue para 360-4076 ou 360-4048 (Prof. Roberto Pontarolo).

Atenciosamente,

Cassyano J. Correr
Aluno de mestrado
Ciências Farmacêuticas - UFPR

[4]A equipe principal da pesquisa se compromete a não divulgar, sob hipótese alguma, as formulações levantadas (incluindo a composição das bases) e a que farmácias de manipulação pertencem. O anonimato total está garantido nesta pesquisa.