

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Olívia Brito de Oliveira Moreira

Estudo de métodos para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas

Juiz de Fora

2020

Olivia Brito de Oliveira Moreira

Estudo de métodos para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2020

Moreira, Olívia Brito de Oliveira.

Estudo de métodos para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas / Olívia Brito de Oliveira Moreira. -- 2020. 106 f.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Hidroquinona. 2. Benzoquinona. 3. Cronoamperometria. 4. Doenças dermatológicas. I. Oliveira, Marcone Augusto Leal de, orient. II. Título.

Olivia Brito de Oliveira Moreira

Estudo de Métodos para Determinação de Hidroquinona em Formulações Farmacêuticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

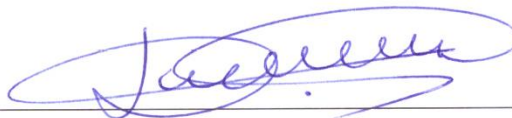
Aprovada em 18 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



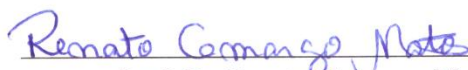
Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus

Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meu pais Solange e José Américo.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Universo pela vida, proteção e conquistas.

Aos meu pais por todo amor, cuidado e dedicação. E pelo apoio e incentivo.

A todos meus amigos, de infância até a faculdade, pela amizade, incentivo e pelos momentos especiais.

Ao meu orientador Marcone, pelos conselhos, pela paciência e confiança e por todos os aprendizados nesses dois anos de pós-graduação.

A todos do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) por terem me recebido de braços abertos e por me ajudarem em todos as dificuldades durante esses dois anos. Em especial, agradeço à Jéssica e a Maria Patrícia pela parceria, amizade e incentivo diário. Agradeço ao grupo pela troca de conhecimento, pelos ensinamentos e por toda amizade.

Aos colegas de graduação e pós-graduação.

A todos do Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separações Analíticas pelo auxílio na realização das análises eletroquímicas desenvolvidas neste trabalho.

Ao Grupo de Físico-Química de Sólidos e Interfaces, ao Núcleo de Estudos em Catálise e Síntese Orgânica e ao Laboratório de Espectroscopia Vibracional pelo auxílio nas análises espectroscópicas realizadas neste trabalho.

À Faculdade de Farmácia da UFJF pela doação de reagentes usados neste trabalho.

Aos professores, alunos e demais funcionários do Departamento de Química da UFJF.

Aos professores membros da banca examinadora de qualificação e defesa por todas contribuições.

À Universidade Federal de Juiz de Fora.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

A hidroquinona é um composto fenólico usado como substância de referência em medicamentos voltados para tratamento de discromias induzidas por processos de hiperpigmentação. Doenças dermatológicas desse tipo são frequentes e estão entre as principais causas de procura por orientação médica, segundo dados recentes da Sociedade Brasileira de Dermatologia. No Brasil, a hidroquinona é comercializada em formulações farmacêuticas de uso tópico com até 4% de concentração, porém, apesar de amplamente utilizada alguns estudos alertam sobre efeitos adversos do uso prolongado da substância. Um dos fatores considerados é a estabilidade da molécula, visto que a hidroquinona é facilmente oxidada e seu produto de degradação, a benzoquinona, pode estar associado a mecanismos genotóxicos. Portanto, o doseamento desses medicamentos é importante para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi a elaboração de um estudo investigativo direcionado ao esclarecimento sobre a estabilidade química da hidroquinona, bem como, a implementação de uma metodologia analítica de doseamento. Em seu desenvolvimento, foram exploradas técnicas espectroscópicas, eletroanalíticas e de eletromigração. Uma vez determinado que os padrões adquiridos para este trabalho estavam de acordo com a certificação de pureza, bem como, que o pH é um fator determinante visto que está relacionado às reações de oxido-redução dos compostos, uma metodologia analítica para doseamento de hidroquinona por cronoamperometria foi desenvolvida. Foi utilizado um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um eletrodo auxiliar de platina, todos imersos em uma célula eletrolítica preenchida com solução tampão BR ajustada em pH 5,5, este escolhido por ser o pH em que a amostra é mantida. O método otimizado consistiu na análise de hidroquinona mediante aplicação de um potencial de oxidação fixo de 0,4 V, após a solução ser mantida em agitação por 20 segundos. Alguns parâmetros de desempenho analítico foram verificados, a seletividade e a linearidade foram certificadas e a exatidão do método foi estabelecida por ensaios de recuperação em três níveis de concentração cujos valores variam entre 98 a 111%. Uma amostra de gel dermatológico contendo 4% (m/m) de hidroquinona foi analisada após procedimento de preparo otimizado, e foi encontrada uma concentração de 3,62% (m/m). Não foram encontrados vestígios da oxidação de hidroquinona na amostra analisada.

Palavras-chave: Hidroquinona. Benzoquinona. Cronoamperometria. Doenças dermatológicas.

ABSTRACT

Hydroquinone is a phenolic compound used as a reference substance in pharmaceuticals designed for treatments of dyschromias induced by hyperpigmentation processes. Dermatological diseases of this segment are very ordinary and appear among the main causes of the medical advice demand, according to recent data published by the Brazilian Society of Dermatology. In Brazil, hydroquinone is found in some skin-bleaching formulations with up to 4% concentration, however, despite of being widely used, some authors have been published papers warning about the adverse effects caused by its long-term use. One of the criteria considered is the molecule stability, since the hydroquinone easily undergoes oxidation and its product, benzoquinone, could be associated with genotoxic mechanisms. Therefore, the dosage of these drugs is important to guarantee their quality, safety and efficacy. Thus, the aim of this work was to develop an investigative study to enlighten the chemical stability of hydroquinone in those products, as well as the development of an analytical quantitative methodology. Over the experimental procedure, spectroscopic, electroanalytical and electromigration techniques were explored. Once established the standard materials acquired for this work are within the purity certification parameters and the pH is a determining factor due its directly relation to the redox reaction of the analyte, an analytical method for quantifying hydroquinone by chronoamperometry has been developed. A glassy-carbon working electrode, a reference electrode (Ag/AgCl) and a platinum auxiliary electrode were used. All of them immersed in an electrolytic cell filled with BR buffer solution adjusted to pH 5.5. The pH was chosen according to the condition the sample is kept. The optimized method is based on the hydroquinone oxidation by a 0.4 V fixed potential application, after the solution been kept stirring for 20 s. Some analytical validation parameters were verified. Selectivity and linearity were certified and the accuracy of the method was calculated by recovery tests at three concentration levels leading to a 98-111% range. A skin-bleaching gel sample containing 4% (w/w) of hydroquinone was tested following the optimized method. As a result, a concentration of 3.62% (w/w) was obtained. No trace of hydroquinone oxidation was found in the analyzed sample.

Keywords: Hydroquinone. Benzoquinone. Chronoamperometry. Dermatological diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Representação da estrutura molecular da hidroquinona	20
Figura 2.	- Representação da reação de oxidação da hidroquinona	22
Figura 3	- Representação de um equipamento de eletroforese capilar.....	27
Diagrama 1	- Representação simplificada do processo de absorção de radiação eletromagnética	31
Figura 4	- Espectro eletromagnético com representações dos fenômenos associados às técnicas espectroscópicas	31
Figura 5	- Representação de uma célula eletrolítica tipicamente usada em voltametria	34
Figura 6	- Representação gráfica do potencial de onda triangular (a) e do voltamograma cíclico (b)	36
Figura 7	- Representação gráfica da aplicação de potencial vs tempo (a) e corrente vs tempo (b)	37
Diagrama 2	- Distribuição da hidroquinona ao longo da escala de pH	50
Figura 8	- Espectro de absorção ultravioleta da hidroquinona	51
Figura 9	- Eletroferograma da hidroquinona a 10 mmolL^{-1} por CZE-UV.....	51
Figura 10	- Eletroferograma da hidroquinona a 2 mmolL^{-1} em 10% (v/v) de metanol por MEKC-UV.....	53
Figura 11	- Eletroferogramas da hidroquinona 2 mmolL^{-1} e do metanol em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 por CZE- UV.....	54
Figura 12	- Coloração das soluções de hidroquinona de acordo com variação no pH	56
Figura 13	- Espectro de absorção ultravioleta da benzoquinona.....	56
Figura 14	- Eletroferograma da benzoquinona 2 mmolL^{-1} e do metanol em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 por CZE-UV.....	57
Figura 15	- Eletroferogramas da hidroquinona 5 mmolL^{-1} em 10% (v/v) metanol obtidos em (a) 287 nm e (b) 248 nm.....	59
Figura 16	- Espectros de absorção UV gerados dos experimentos por MEKC e obtidos em (a) 287 nm e (b) 248 nm e espectro teórico da hidroquinona (em vermelho)	60

Figura 17	- Sobreposição dos espectros de absorção UV da hidroquinona e benzoquinona obtidos no experimento por CZE-UV com ajuste de pH de 2 a 12	61
Figura 18	- Espectros vibracionais de absorção no infravermelho e espalhamento Raman da (a) hidroquinona e (b) benzoquinona	63
Figura 19	- Espectro de RMN ¹³ C da hidroquinona em fase sólida.....	65
Figura 20	- Espectro de RMN ¹³ C da benzoquinona em fase sólida.....	65
Figura 21	- Análise comparativa dos espectros Raman da amostra real, da matriz replicada em laboratório e dos padrões das espécies estudadas	66
Figura 22	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da hidroquinona em D ₂ O	67
Figura 23	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da benzoquinona em D ₂ O.....	68
Figura 24	- Representação da reação de troca de hidrogênios da hidroxila da hidroquinona pelos deutérios do D ₂ O.....	68
Figura 25	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da hidroquinona em DMSO-d ₆	69
Figura 26	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da benzoquinona em DMSO-d ₆	69
Figura 27	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da hidroquinona em DMSO-d ₆ após uma semana do preparo.....	70
Figura 28	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da benzoquinona em DMSO-d ₆ após uma semana do preparo.....	70
Figura 29	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da hidroquinona em D ₂ O após uma semana do preparo	71
Figura 30	- Espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da benzoquinona em D ₂ O após uma semana do preparo.....	72
Figura 31	- Voltamogramas cíclicos da hidroquinona em intervalo de pH de 2 a 12.....	73
Figura 32	- Relação entre pH e potenciais de pico de oxidação da hidroquinona (a) e redução da benzoquinona (b)	77
Figura 33	- Voltamogramas cíclicos da hidroquinona em (a) pH 2, (b) pH 4 e (c) pH 6	78
Figura 34	- Esquema representativo do mecanismo de oxidação e redução de quinonas.....	79

Figura 35	- Voltamogramas cíclicos da hidroquinona (a) e benzoquinona (b) em intervalo de pH de 2 a 10.....	80
Figura 36	- Voltamograma cíclico da hidroquinona em pH 4	81
Figura 37	- Voltamograma cíclico parcial da hidroquinona em pH 5,5.....	82
Figura 38	- Voltamogramas cíclicos da hidroquinona com adição de alíquotas sucessivas de benzoquinona.....	83
Figura 39	- Cronoamperogramas resultantes da adição de alíquotas de benzoquinona à solução de hidroquinona.....	84
Figura 40	- Curva das alíquotas de benzoquinona adicionadas à solução de hidroquinona <i>versus</i> corrente gerada por cronoamperometria.....	85
Fluxograma 1	- Possíveis abordagens para análise quantitativa de hidroquinona	87
Figura 41	- Cronoamperogramas resultantes do teste de seletividade.....	90
Figura 42	- Cronoamperograma resultante da redução da amostra de gel dermatológico contendo hidroquinona.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Técnicas espectroscópicas explicitadas de acordo com a região correspondente do espectro eletromagnético	30
Tabela 2	- Descrição das condições experimentais dos experimentos por eletroforese capilar	41
Tabela 3	- Condições experimentais dos ensaios por voltametria cíclica	44
Tabela 4	- Parâmetros experimentais do procedimento para determinação dos coeficientes de difusão da hidroquinona e da benzoquinona	45
Tabela 5	- Parâmetros experimentais otimizados para as análises quantitativas por cronoamperometria	46
Tabela 6	- Atribuição das bandas dos espectros vibracionais de absorção no Infravermelho e espalhamento Raman	64
Tabela 7	- Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação da curva de calibração externa	91
Tabela 8	- Valores de R (%) e RSD (%)	92
Tabela 9	- Valores referentes ao doseamento da amostra de hidroquinona em gel dermatológico preparada em eletrólito	93
Tabela 10	- Avaliação comparativa dos resultados de doseamento de hidroquinona em gel dermatológico em amostras preparadas com e sem metanol	93
Tabela 11	- Valores de quantificação da hidroquinona em amostras de gel dermatológico por procedimento otimizado	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
BGE	<i>Background Electrolyte</i>
BR	Britton-Robinson
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CEC	<i>Capillary Electrochromatography</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	<i>Cyclic Voltammetry</i>
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
EDTA	edetato dissódico
EOF	<i>Electroosmotic Flow</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IR	<i>Infrared</i>
IV	Infravermelho
MEKC	<i>Micellar Electrokinect Capillary Chromatography</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
SBD	Sociedade Brasileira de Dermatologia
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TAT	tempo total de análise
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	absorção ultravioleta

UV-VIS Ultravioleta-Visível
VC Voltametria cíclica

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔE	Transferência de energia
A	Absorvância
A	Área do eletrodo
b	Caminho óptico
c	Concentração da solução
C	Concentração
C_a	Concentração da amostra
C_{a+p}	Concentração da amostra fortificada
C_{oxi}	Concentração da espécie oxidada
C_p	Concentração do padrão adicionado
C_{red}	Concentração da espécie reduzida
D	Coefficiente de difusão
E	Campo elétrico, potencial
$E_{1/2}$	Potencial de meia-onda
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
n	Número de elétrons
P	Radiação transmitida
P_0	Radiação incidente
pH	Potencial hidrogeniônico
pK_a	Constante de dissociação ácida
r	Coefficiente de correlação
R	Percentual de recuperação
T	Transmitância
α	Fração de distribuição
β	Deformação angular assimétrica no plano
γ	Deformação angular fora do plano
δ	Deformação angular simétrica no plano

ε	Constante dielétrica
ε	Absortividade molar do analito
ζ	Potencial zeta
η	Viscosidade
λ	Comprimento de onda
v	Deformação axial
v	Velocidade de varredura
τ	Deformação angular assimétrica no plano (torção)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	DOENÇAS DERMATOLÓGICAS	17
1.2	HIDROQUINONA	19
1.3	ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ESTABILIDADE QUÍMICA DA HIDROQUINONA	21
1.4	LEGISLAÇÃO	24
1.5	METODOLOGIAS DE DOSEAMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE	25
1.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS	26
1.6.1	Eletroforese capilar	26
1.6.2	Espectroscopia	29
1.6.3	Eletroanalítica	33
2	OBJETIVO	38
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	39
3.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	40
3.2.1	Eletroforese Capilar	40
3.2.2	Espectroscopia de absorção Ultravioleta	42
3.2.3	Espectroscopia Raman	42
3.2.4	Espectroscopia de absorção no Infravermelho	42
3.2.5	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
3.2.6	Métodos Eletroanalíticos: Estudos exploratórios	43
3.2.6.1	<i>Voltametria cíclica</i>	43
3.2.6.2	<i>Determinação dos coeficientes de difusão</i>	45
3.2.6.3	<i>Cronoamperometria</i>	45
3.2.7	Análises quantitativas	46
3.2.8	Parâmetros de desempenho analítico	46
3.2.8.1	<i>Seletividade</i>	46
3.2.8.2	<i>Linearidade</i>	47
3.2.8.3	<i>Exatidão</i>	47

3.2.9	Preparo e análise da amostra	47
3.2.10	Preparo da matriz do gel dermatológico	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1	ELETROFORESE CAPILAR	49
4.2	MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS	63
4.3	MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	72
4.3.1	Reversibilidade da reação	73
4.3.2	Determinação dos coeficientes de difusão	75
4.3.3	Relação entre Potenciais de pico e pH	77
4.3.4	Mecanismo de reação	78
4.3.5	Determinação do conteúdo inicial das soluções padrão	79
4.4	CONSIDERAÇÕES GERAIS E ELABORAÇÃO DA PROPOSTA DE QUANTIFICAÇÃO DA HIDROQUINONA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS	86
4.5	MÉTODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CRONOAMPEROMETRIA	89
4.5.1	Desenvolvimento e otimização	89
4.5.2	Seletividade	89
4.5.3	Linearidade	90
4.5.4	Exatidão	91
4.5.5	Análise das amostras	92
5	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

A química analítica é um ramo da ciência que lida com métodos de identificação, separação e quantificação de compostos químicos de materiais naturais ou artificiais (TOOMULA *et al.*, 2011). Dentro de um estudo analítico podem-se almejar resultados qualitativos, que fornecem informações de identidade do analito e da amostra, e resultados quantitativos, que por sua vez fornecem dados numéricos sobre a proporção de um ou mais analitos em uma determinada amostra (CHAUHAN *et al.*, 2015; TOOMULA *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de uma metodologia analítica é o processo de selecionar um procedimento para determinação da composição de um material. A escolha do método é baseada em fatores como propriedades químicas dos analitos, concentração, matriz da amostra, tempo e custo de análise (CHAUHAN *et al.*, 2015; TOOMULA *et al.*, 2011). Além disso, os instrumentos analíticos desempenham um papel fundamental no processo de coleta de informações confiáveis e de alta qualidade, estes devem ser selecionados de acordo com a proposta e o escopo do método analítico (CHAUHAN *et al.*, 2015).

Com relação às formulações farmacêuticas, os métodos analíticos são fundamentais na descoberta, desenvolvimento e produção de fármacos. Os métodos oficiais que resultam desse processo são usados em laboratórios de controles de qualidade para assegurar a eficiência dos produtos que chegam ao consumidor (BREAUX *et al.*, 2003).

Ao longo deste trabalho será descrito o procedimento de seleção e desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas. Resumidamente, a hidroquinona é um princípio ativo contido em medicamentos voltados para tratamentos de doenças dermatológicas originadas de hiperpigmentação (NORDLUND *et al.*, 2006). Nesta seção introdutória serão descritos importantes tópicos relacionados a este presente trabalho.

1.1 DOENÇAS DERMATOLÓGICAS

Nas últimas décadas, um dos mais importantes tópicos de pesquisa em dermatologia e cosmética é o estudo das anomalias relacionadas à pigmentação da pele, como as condições resultantes de hiperpigmentação (DRAELOS, 2007; GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016). A hiperpigmentação cutânea é um distúrbio caracterizado pelo surgimento de manchas escuras, localizadas em sua maioria no rosto e ocasionalmente em outras áreas do corpo. Tais anomalias

ainda podem apresentar outros sinais indesejados e variam desde lesões simples ou múltiplas, até condições mais severas (GHANBARZADEH *et al.*, 2015; NICOLAIDOU & KATSAMBAS, 2014).

Sintomas característicos de doenças dermatológicas são frequentes entre aqueles que procuram cuidados com a saúde especializado, e estão entre as causas iniciais da demanda de pacientes ambulatoriais (SBD *et al.*, 2018). Há diversos estudos cujos autores notificam que essas doenças podem resultar em um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados, especialmente os pacientes crônicos (KARIMKHANI *et al.*, 2017; SBD *et al.*, 2018; SETH *et al.*, 2017).

Em relação às doenças dermatológicas decorrentes de processos de hiperpigmentação, de acordo com estudo realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD), no ano de 2006, transtornos desse tipo representaram o terceiro maior grupo de doenças diagnosticadas em práticas dermatológicas no país. Sendo a principal causa de procura por orientação médica entre pacientes de 40 a 64 anos, representando 11,6 % do total de diagnósticos (HANDEL *et al.*, 2014; SBD, 2006).

A SBD, em estudo semelhante realizado no ano de 2018, registra o fotoenvelhecimento em segundo lugar e o melasma em sétimo no total de diagnósticos em práticas dermatológicas, ambas se manifestam com sinais de hiperpigmentação. Entre mulheres de 25 a 57 anos, as anomalias citadas aparecem em primeiro e segundo lugar, respectivamente, totalizando 17.1 % do total de diagnósticos realizados para pacientes dentro dessa faixa etária (SBD *et al.*, 2018).

O fotoenvelhecimento cutâneo é causado majoritariamente por exposição excessiva à luz solar e pode provocar ressecamento, manchas, alteração na textura, aumento no aparecimento de rugas, perda de elasticidade e outros efeitos leves (SBD, 2020a). O melasma, por sua vez, é caracterizado pelo aparecimento de manchas escuras com contornos irregulares. A doença afeta principalmente as mulheres, homens representam apenas 10 % dos diagnosticados. Aliado à exposição excessiva ao sol, é frequentemente relacionado à gravidez e ao uso de anticoncepcionais e outras drogas (MIOT *et al.*, 2009; NICOLAIDOU & KATSAMBAS, 2014; SBD, 2020b).

Demais desordens decorrentes de hiperpigmentação aparecem na forma de sardas, lentigos e coloração desigual, além de condições menos comuns como dermatites de contato pigmentosa, eritromelanoze folicular e outras (DREHER *et al.*, 2013; GAO & LEGIDO-QUIGLEY, 2011; MEYS, 2017). O surgimento de anomalias desse tipo está associado à produção excessiva ou à distribuição irregular de melanina, pigmento que define a coloração

natural da pele e atua na proteção direta contra radiação ultravioleta (BORGES *et al.*, 2018; DO *et al.*, 2017; GHANBARZADEH *et al.*, 2015; MIOT *et al.*, 2009).

A origem na disfunção da produção e distribuição da melanina inclui alguns fatores genéticos e ambientais, são estes, doenças sistêmicas, gravidez, hipertireoidismo, exposição excessiva à luz ultravioleta, processos pós-inflamatórios resultantes de acne, traumas, queimaduras, entre outros. E ainda, uso de drogas, hormônios, agentes fotossensibilizantes e alguns medicamentos (DRAELOS, 2007; DREHER *et al.*, 2013; GHANBARZADEH *et al.*, 2015; MEYS, 2017; NICOLAIDOU & KATSAMBAS, 2014).

A produção de melanina, ou melanogênese, ocorre em células presentes na camada externa da pele (epiderme), chamadas de melanócitos (GALYMANI-ROVIRA *et al.*, 2016; MIOT *et al.*, 2009; PARVEZ *et al.*, 2006; YAMAGUCHI & HEARING, 2014). Sua biossíntese é estimulada por um complexo processo de reações oxidativas, catalisado em sua maior parte pela enzima tirosinase (GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2008).

A tirosinase é uma metaloenzima dinuclear de cobre encontrada exclusivamente nos melanócitos, cuja função principal é catalisar a oxidação de mono e difenóis (DO *et al.*, 2017; PARVEZ *et al.*, 2006). Na biossíntese da melanina, atua em três etapas fundamentais. São estas, as duas reações iniciais que produz a dopaquinona a partir da tirosina, e ao final do processo gerando a indol-6-quinona, precursor imediato da melanina (DO *et al.*, 2017; MIOT *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

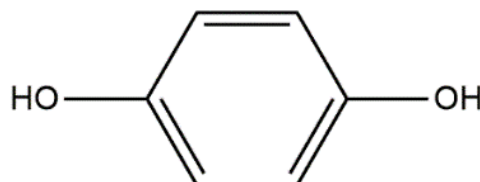
Há muitos tratamentos disponíveis para o combate dessas doenças, em geral, atuam na diminuição ou bloqueio local da melanogênese, O mais comum é a combinação de protetor solar com medicamentos de uso tópico cuja formulação contenha alguma substância capaz de inibir a funcionalidade da enzima tirosinase (GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016; SBD *et al.*, 2018).

1.2 HIDROQUINONA

A referência principal entre medicamentos de uso tópico direcionados ao tratamento de doenças dermatológicas decorrentes do processo de hiperpigmentação, como o melasma e as demais supracitadas, é a hidroquinona. A substância é considerada a mais forte e eficiente entre os agentes despigmentastes similares e tem sido usada com sucesso por mais de 40 anos (HUIYING *et al.*, 2017; NORDLUND, *et al.*, 2006; MOLDOVAN *et al.*, 2017).

A hidroquinona (**Figura 1**), ou 1,4-dihidroxibenzeno, é um composto fenólico que ocorre naturalmente no meio-ambiente ou é sintetizada (DRAELOS *et al.*, 2010; DADZIE & PETIT, 2009). Quando pura, apresenta-se na forma de cristais brancos solúveis em água, metanol, etanol e éter etílico (BRASIL, 2019).

Figura 1 - Representação da estrutura molecular da hidroquinona.



Fonte: Brasil (2019).

O composto apresenta inúmeras utilidades, principalmente devido suas propriedades como agente redutor em meio aquoso. É usado como antioxidante na fabricação de borracha e tintas, atua como inibidor de polimerização de alguns produtos, e ainda como estabilizante em vernizes e óleos lubrificantes. Porém, sua aplicação principal é na indústria farmacêutica como princípio ativo de produtos destinados ao tratamento de discromias (HUIYING *et al.*, 2017; USA, 2009).

A ação despigmentante da hidroquinona foi reportada pela primeira vez por Oettel em 1936. Anos depois, no começo da década de 1950, a substância começou a ser comercializada em algumas regiões dos Estados Unidos da América como um agente fotoprotetor. Na ocasião, foi observado regiões despigmentadas na pele de alguns dos usuários do produto. A partir dessa observação, a comunidade médica iniciou uma série de estudos clínicos voltados para investigação da eficácia da hidroquinona, bem como para a avaliação de sua viabilidade como potencial agente despigmentante para tratamentos de discromias em geral (NORDLUND *et al.*, 2006; NORDLUND, 2015).

Em inúmeras publicações, autores investigam e reportam o comportamento da hidroquinona em concentrações diversas. Em 1982, a FDA (*Food and Drug Administration*) registrou a substância como segura e eficiente e liberou seu uso em cosméticos e medicamentos classificados como desmelanizantes. Dessa forma, a hidroquinona se tornou a substância de primeira escolha para tratamento de discromias, e passou a ser prescrita mundialmente (DADZIE & PETIT, 2009; LEVITT, 2007; NORDLUND, 2015). No Brasil, atualmente, diversas formulações contendo este princípio ativo, com ou sem associações, são

comercializadas na forma de cremes ou géis dermatológicos em farmácias tradicionais e magistrais (CALAÇA *et al.*, 2011; GARCÍA *et al.*, 2007).

Outros autores investigam as interações da hidroquinona com a tirosinase e a tirosina, substrato inicial da melanina, na intenção de definir como a substância atua no organismo (STRATFORD *et al.*, 2012; PARVEZ *et al.*, 2006; RAMSDEN & RILEY, 2014). Apesar das inúmeras proposições, o mecanismo exato ainda não é bem elucidado pela comunidade científica. Porém, é afirmado que a hidroquinona não elimina completamente a melanina e sim, interrompe localmente o processo de síntese do pigmento (CALAÇA *et al.*, 2011; GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016; NORDLUND *et al.*, 2006; STRATFORD *et al.*, 2012).

Em geral, é bem estabelecido que a hidroquinona é capaz de participar de processos metabólicos nos melanócitos pela inibição da enzima tirosinase, em função da sua estrutura química ser similar ao do precursor da melanina. Dessa forma, a espécie possibilita a reversão do processo de acúmulo localizado do pigmento, característico das doenças dermatológicas em questão (CALAÇA *et al.*, 2011; DADZIE & PETIT, 2009; GALIMANY-ROVIRA *et al.*, 2016).

No entanto, apesar da hidroquinona ser considerada a mais eficiente dos agentes despigmentantes e ser o composto mais usado por muitos anos, ao longo das últimas décadas alguns órgãos reguladores vem expressando preocupações quanto ao seu consumo, principalmente quando usado sem prescrição médica e a longo prazo (GARCÍA *et al.*, 2007; LEVITT, 2007; MOLDOVAN *et al.*, 2017).

Nesse sentido, há inúmeras publicações que descrevem experimentos laboratoriais e clínicos aplicados na determinação dos potenciais efeitos toxicológicos da hidroquinona, e que buscam evidências que confrontem ou apoiem o alerta dos órgãos de vigilância responsáveis (THEÓPHILE *et al.*, 2013).

1.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ESTABILIDADE QUÍMICA DA HIDROQUINONA

As preocupações relacionadas com a segurança da hidroquinona começaram por volta dos anos 2000. No ano de 2006, a FDA registrou uma proposta para banir a comercialização de todos os produtos contendo a hidroquinona. Essa proposta surgiu após a falha dos fabricantes em atender a uma solicitação da própria FDA, que visava a comprovação científica da segurança da hidroquinona. Na época, a Europa já havia banido o uso da substância em cosméticos (DADZIE & PETIT, 2009; LEVITT, 2007; NORDLUND, 2015). Atualmente, a

FDA ainda permite o uso da hidroquinona em medicamentos, porém, o composto ainda segue na lista de substâncias usadas como matéria-prima de fármacos sob avaliação (USA, 2020).

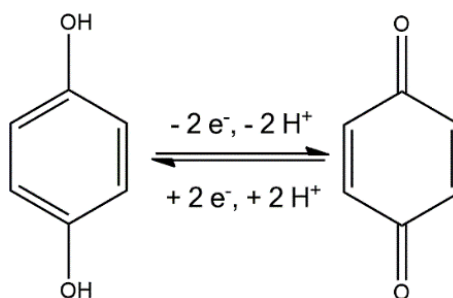
Inicialmente, as questões levantadas sobre o caráter tóxico da hidroquinona foram baseadas no fato do composto ser um derivado do benzeno, que é um conhecido agente hematotóxico, ou seja, oferece risco de doenças como anemia, leucemia e trombocitopenia (DADZIE & PETIT, 2009; NORDLUND *et al.*, 2006; SNYDER & HELDI, 1996). E ainda, foram observados efeitos adversos em usuários contínuos de cosméticos contendo altas concentrações de hidroquinona, em geral, acima de 5 % (NORDLUND *et al.*, 2006).

A partir do levantamento das suspeitas sobre os aspectos toxicológicos da hidroquinona, muitos estudos sobre o tema começaram a se popularizar dentro da comunidade dermatológica (DADZIE & PETIT, 2009). Muitos autores avaliam o efeito terapêutico da hidroquinona em tratamento de discromias (ORTTONE & PASSERON, 2005). De modo geral, é reportado que a eficiência da hidroquinona está diretamente relacionada à concentração usada na preparação do produto, aos componentes usados para a estabilização e à composição do produto final (BORGES *et al.*, 2018; ORTTONE & PASSERON, 2005).

A garantia da estabilidade química da hidroquinona em formulações farmacêuticas também é de grande importância, pois o composto é facilmente oxidado. Exposição ao ar já é fator suficiente para desencadear a oxidação. Outras condições podem ainda amplificar a taxa de oxidação, como a alta concentração de oxigênio, alto pH e exposição a luz (ABRAHAM *et al.*, 2011; BORGES *et al.*, 2018; DRAELOS *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2007). Quando oxidada, a hidroquinona modifica sua coloração de branco para amarelado e por fim, marrom (DRAELOS *et al.*, 2010).

O mecanismo da reação é amplamente estudado, e é bem estabelecido que oxidação da hidroquinona é um processo termodinamicamente reversível que ocorre através da transferência de dois elétrons e dois prótons (**Figura 2**) (FLORES-DÍAZ *et al.*, 2018; SHAI DAROVA *et al.*, 2003).

Figura 2 - Representação da reação de oxidação da hidroquinona.



Fonte: Flores-Días (2018).

O produto de degradação da hidroquinona é a 1,4-benzoquinona, ou *p*-benzoquinona, que não é eficaz para o tratamento de hiperpigmentações (ABBAS *et al.*, 2015; DRAELOS *et al.*, 2010). Benzoquinonas em geral, são compostos não aromáticos derivados da oxidação de estruturas fenólicas, como o próprio fenol, o catecol, e a hidroquinona. São produzidas sinteticamente, além de ocorrerem naturalmente no meio ambiente (ABRAHAM *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2010; TURKAY *et al.*, 2018).

A benzoquinona, como é conhecida a espécie em questão, se apresenta na forma de cristais amarelados com odor irritante e é solúvel em água, etanol e éter (PUBCHEM, 2020). Em meio aquoso pode induzir reações redox, transformações ácido-base e formação de semiquinona e hidroquinona (TURKAY *et al.*, 2018). No entanto, apresenta aspectos toxicológicos importantes, e se estiver presente em formulações farmacêuticas é absorvido através da pele podendo causar efeitos adversos irreversíveis (ABBAS *et al.*, 2015; DADZIE & PETIT, 2009; DAS *et al.*, 2010; DRAELOS *et al.*, 2010).

Um estudo desenvolvido por Wester e colaboradores (1998) investiga o metabolismo e a biodisponibilidade da hidroquinona *in vivo* e *in vitro*. De acordo com a pesquisa, e demais publicações semelhantes, a hidroquinona penetra a epiderme, atravessa a derme e atinge a circulação sistêmica. Em relação à benzoquinona, o autor ainda reporta a presença do produto de degradação nos metabólitos da hidroquinona, também na circulação sistêmica (NORDLUND *et al.*, 2006; WESTER, *et al.*, 1998).

Outros estudos abordam ainda a participação da benzoquinona em processos bioquímicos vitais e têm comprovado a natureza carcinogênica dessa substância (SOUSA *et al.*, 2016). Evidências científicas, também obtidas através de testes *in vitro* e *in vivo*, afirmam que a benzoquinona está associada à formação de adutos com o DNA, e envolvida em outros mecanismos genotóxicos que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BOLTON *et al.*, 2010; DAS *et al.*, 2010; NORDLUND *et al.*, 2006; SIRAKI *et al.*, 2004).

Quando presentes em meio fisiológico, as ERO podem causar danos em membranas, proteínas, lipídeos e em células essenciais, resultando em efeitos toxicológicos que podem induzir apoptose (suicídio celular), carcinogênese e estresse oxidativo (CHUNG *et al.*, 2006; MONKS *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2003).

A fim de retardar o processo de oxidação da hidroquinona, e assim, evitar a formação da benzoquinona, antioxidantes como bissulfito de sódio e ácido ascórbico geralmente são usados para preservar a estabilidade química da formulação farmacêutica (BORGES *et al.*,

2018). Além disso, é essencial que a embalagem evite a exposição do produto ao ar e a luz (GAO *et al.*, 2008).

Em relação à concentração dos produtos, o uso tópico da hidroquinona de 2 a 4 % tem sido usado com sucesso em tratamento de melasmas e outras doenças do mesmo seguimento (GAO *et al.*, 2008). No entanto, devido seus aspectos toxicológicos, muitos dos estudos citados descrevem as consequências recorrentes do uso prolongado da substância (HUIYING *et al.*, 2017). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reporta que cremes contendo a partir de 5 % de hidroquinona não são recomendados, pois já podem causar reações adversas (MATSUMOTO *et al.*, 2016).

Os efeitos do uso contínuo e prolongado da hidroquinona podem ser agudos ou crônicos, e podem se manifestar como dermatites, descoloração das unhas, processos inflamatórios e algumas condições mais severas como a ocronose exógena, dermatose caracterizada pelo aparecimento de manchas azuladas, e a persistente descoloração chamada de leucoderma (GAO *et al.*, 2008; HUIYING *et al.*, 2017; ORTTONE & PASSERON, 2005; RIBAS *et al.*, 2010). E ainda, o composto pode servir como gatilho para outras reações químicas com potencial efeito toxicológico, portanto, de grande risco à saúde (MONKS *et al.*, 1992).

Além disso, em virtude de suas características toxicológicas e sua baixa degradabilidade em meio ambiente, quinonas, assim como demais compostos fenólicos, são consideradas poluentes ambientais pelo USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) (BIAN *et al.*, 2019; NAIK & SWANY, 2017; PEREIRA *et al.*, 2014). Por ser extensivamente usada em medicamentos de uso tópico, efluentes podem ser danosos para humanos e seu meio ambiente (THÉOPHILE *et al.*, 2013).

1.4 LEGISLAÇÃO

A comercialização da hidroquinona é permitida apenas com prescrição médica. A União Europeia que usualmente tolerava um máximo de concentração de 2 %, no ano de 2002, proibiu a comercialização da substância e a substituiu por outros princípios ativos similares (THÉOPHILE *et al.*, 2013). A hidroquinona também aparece na lista de ingredientes proibidos em cosméticos no Canadá desde 2008. No Reino Unido e Japão seu uso é completamente banido (MATSUMOTO *et al.*, 2016; USA, 2009; ZHANG & ZHENG, 2017). Nos Estados Unidos, a FDA ainda permite o uso de medicamentos contendo até 2% da substância (USA 2009; SCHWARTZ *et al.*, 2019).

No Brasil, o controle é feito pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o uso da hidroquinona em cosméticos com até 2 % de concentração era permitido até 2016, ano em que é citada na RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) 83/2016, que lista as substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Atualmente, em medicamentos especificados como desmelanizantes comercializados na forma de gel e creme dermatológico, a hidroquinona é permitida na concentração máxima de 4 % (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2016).

Em relação ao produto de oxidação, a benzoquinona, uma vez que não é utilizada como princípio ativo de fármacos, até o momento não foram encontradas normas técnicas e/ou comunicados oficiais das agências reguladoras sobre o nível máximo de concentração permitida da substância.

1.5 METODOLOGIAS DE DOSEAMENTO E CONTROLE DE QUALIDADE

A preocupação pública com os riscos de compostos químicos usados em cosméticos e fármacos cresceu exponencialmente na última década. E a segurança desses princípios ativos tem atraído muita atenção à comunidade científica (ESTEKI *et al.*, 2016; GAO & LEGIDO-QUIGLEY, 2011). Assim, tendo em vista os potenciais efeitos toxicológicos associados ao consumo demasiado da hidroquinona, o doseamento da substância em medicamentos disponíveis no mercado é de grande importância para a proteção do consumidor (LIN *et al.*, 2005).

A metodologia oficial de doseamento da hidroquinona indicada pela Farmacopeia Brasileira, descrita pela ANVISA, e pela Farmacopeia Americana (USP, do inglês *United States Pharmacopeia*) é a titulação com sulfato de cério (IV) em meio de ácido sulfúrico (BRASIL, 2019; USA, 2012). Outros métodos alternativos de doseamento da hidroquinona são propostos e envolvem uso de técnicas diversas, como espectrofotometria UV-VIS (CALAÇA *et al.*, 2011; PANKTI *et al.*, 2013), HPLC (GALYMAN-ROVIRA *et al.*, 2016; GAO & LEGIDO-QUIGLEY, 2011; RAJKUMAR *et al.*, 2019; SIDDIQUE *et al.*, 2012), quimioluminescência (MO *et al.*, 2018), métodos eletroanalíticos (BIAN *et al.*, 2019; CUNHA *et al.*, 2013; HUIYING *et al.*, 2017), e eletroforese capilar (DESIDERIO *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2007; SAKODINSKAYA *et al.*, 1992).

Aliado à concentração, outro indicador de qualidade do produto é a estabilidade química da hidroquinona, visto que a substância é facilmente oxidada. Para a benzoquinona, produto de

degradação, não há uma metodologia oficial de doseamento descrita por órgãos de vigilância responsáveis. Contudo, diversos métodos para a determinação da mesma, em matrizes diversas, também são encontrados na literatura.

Por exemplo, há registros da determinação de benzoquinona, associado a outros analitos com estrutura semelhante, em água e resíduos de tratamentos de efluentes de refinarias por HPLC e GC (ANDRADE *et al.*, 2006; BIELICKA-DASZKIEWICK *et al.*, 2012; ZAIDAN *et al.*, 2013), em biomassa lignocelulósica por HPLC (STAGGE *et al.*, 2015) e em mix de padrões fenólicos por GC (MOLNAR-PIER *et al.*, 1995).

No entanto, todos os estudos supracitados não avaliam e não dimensionam a possibilidade da conversão da hidroquinona em benzoquinona em formulações farmacêuticas cujo princípio ativo seja a hidroquinona. Neste contexto, o presente trabalho teve como foco o desenvolvimento de uma metodologia analítica precisa, eficiente e confiável, direcionada não apenas para a determinação quantitativa da hidroquinona, bem como para a verificação de sua estabilidade química no produto final.

Em suma, a meta do trabalho foi a determinação da quantidade nominal de hidroquinona e a verificação da presença do produto de oxidação, a benzoquinona, em formulações farmacêuticas. Dessa forma, inúmeros testes mediados por técnicas analíticas variadas, foram realizados com a finalidade de selecionar uma metodologia que considera o comportamento do analito e de seu produto de degradação, frente às modificações no meio reacional.

1.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para o desenvolvimento desse trabalho, diversas abordagens foram adotadas para melhor descrever o sistema em questão e alcançar a meta estipulada. Foram realizados experimentos utilizando a eletroforese capilar e alguns métodos eletroanalíticos, são estes, voltametria cíclica e cronoamperometria. Além destas, demais ensaios pertinentes foram mediados por técnicas espectroscópicas como a absorção ultravioleta (UV), absorção por infravermelho (IV), espalhamento Raman e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

1.6.1 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados ou espécies

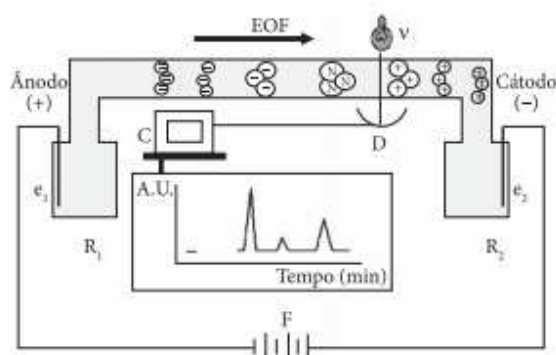
ionizáveis, pela aplicação de um campo elétrico em meio líquido condutor contido em um tubo capilar (BAKER, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Em CE, vários modos de separação com mecanismos distintos e seletividade característica são possíveis (TAVARES, 1996).

Desde de sua introdução, em 1981, a CE evolui e vem ganhando cada vez mais atenção na comunidade científica. Atualmente, desempenha um papel fundamental na Química Analítica, e se aplica desde a determinação de pequenos íons inorgânicos até a caracterização de biomoléculas complexas de alto peso molecular. O campo de pesquisa em CE permanece muito ativo, como indica o fluxo constante e significativo de relatórios científicos sobre a teoria (SPUDEIT *et al.*, 2012; VOETEN *et al.*, 2018).

Com relação a seu desempenho, além de ser altamente seletiva e eficiente, quando comparada aos demais métodos de separação como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (CG) (GC, do inglês *Gas Chromatography*), a CE apresenta vantagens como versatilidade, curto tempo de análise e uso de pouco ou nenhum solvente orgânico, importante dentro dos princípios atuais que descrevem a Química Verde (PRADO, 2003; SPUDEIT *et al.*, 2012; VAZ *et al.*, 2012).

Outro aspecto importante e diferencial da CE é a simplicidade da instrumentação. O sistema consiste basicamente de uma fonte de alta tensão, em geral operada à voltagem constante e/ou corrente constante com valores típicos de 0-50 kV e 0-200 μ A. Além de tubos capilares, eletrodos, um sistema de injeção (como o sistema hidrodinâmico, utilizado neste trabalho) e um detector apropriado (**Figura 3**) (SPUDEIT *et al.*, 2012; TAVARES, 1996).

Figura 3 - Representação de um equipamento de eletroforese capilar.



Onde, R_1 e R_2 são reservatórios, e_1 e e_2 , eletrodos. F identifica a fonte de alta tensão, D, o detector, C, o computador para obtenção dos dados e EOF representa o fluxo eletroosmótico.

Fonte: Spudeit (2012).

A fonte de alta tensão é conectada através dos eletrodos, geralmente de platina, aos dois reservatórios que contém o eletrólito adequado. A fonte é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, cujas extremidades permanecem imersas nos reservatórios. Os capilares são então preenchidos com o eletrólito e servem como um canal de migração. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar é mantido à temperatura constante (SPUDEIT *et al.*, 2012; TAVARES, 1996).

Usado amplamente em CE, o tubo capilar de sílica fundida permite a interação entre os solutos e os grupos silanóis (Si-OH) que compõe a superfície interna do capilar (SPUDEIT, *et al.*, 2012). Quando uma solução contendo íons é usada para preencher o capilar, a superfície interna adquire carga. Os grupos silanóis são ionizados e geram os silanoatos negativamente carregados (Si-O⁻), se utilizado uma solução com pH maior que 3. Para facilitar essa ionização, uma solução fortemente básica é usada para condicionar o capilar, antes do preenchimento com o eletrólito de trabalho (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Os grupos negativamente carregados, atraem os cátions solvatados do eletrólito, desse modo, surge uma distribuição não-homogênea de cargas na solução em proximidade à superfície interna do capilar, chamada de dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado tangencialmente ao sistema, a camada de cátions é atraída em direção ao polo carregado negativamente, o cátodo. Uma vez que estão solvatados, carregam a solução gerando um movimento unilateral de cargas, chamado de fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) (BAKER, 1995; SPUDEIT *et al.*, 2012; TAVARES, 1996).

Com relação ao analito principal do presente trabalho, são encontrados na literatura três publicações que exploram a CE e suas vertentes para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas, quando associada a outros princípios ativos. Lin e colaboradores (2007) e Sakodinskaya e colaboradores (1992) desenvolveram métodos de doseamento por Cromatografia Eletrocínética Micelar Capilar (MEKC, do inglês *Micellar Electrokinect Capillary Chromatography*).

A técnica é baseada na adição de surfactantes acima da concentração micelar crítica à solução que compõe o eletrólito. Nesse sistema, os surfactantes formam fases pseudo-estacionárias, conhecidas como micelas, que interagem com o analito e viabilizam a separação de compostos neutros (HANCU *et al.*, 2013; RIZVI *et al.*, 2011).

Lin utiliza como eletrólito, uma solução contendo 20 mmolL⁻¹ de tampão fosfato (pH 6,5) e 100 mmolL⁻¹ de dodecil sulfato de sódio, ou lauril sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) com detecção UV em 200 nm. Sakodinskaya, por sua vez, usa como eletrólito

uma solução contendo 10 mmolL^{-1} de tampão borato (pH 9,5) e 75 mmolL^{-1} de SDS com detecção UV em 254 nm. Os autores analisam cremes dermatológicos, e conseguem separar a hidroquinona das demais espécies e quantificá-las, com tempo total de análise (TAT) de 7 e 10 minutos respectivamente.

Desiderio e colaboradores (2000) fazem uso da eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês *Capillary Electrochromatography*), para determinar hidroquinona e alguns derivados. A CEC é baseada na utilização de capilares preenchidos com fases estacionárias. É descrita como uma técnica híbrida da CE e da HPLC, por combinar mecanismos de separação envolvidos em ambas técnicas (SEGATO *et al.*, 2009).

Desiderio utiliza um capilar de sílica fundida preenchido com uma fase estacionária de octadecil sílica e como eletrólito uma solução contendo 20 mmolL^{-1} de acetato de amônio (pH 6) e acetonitrila (50-70 %). O método também é eficaz na separação e quantificação da hidroquinona com um TAT de 6 minutos.

Destaca-se, que as publicações citadas são bem sucedidos na separação e quantificação de hidroquinona em produtos do ramo dermatológicos, porém, não desenvolvem uma avaliação aprofundada da estabilidade estrutural do analito e assim, não contabilizam a benzoquinona, como foi proposto neste trabalho.

Além disso, foi proposto inicialmente neste presente trabalho o uso da eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*). Visto que, entre os modos de eletroforese capilar disponíveis, a CZE é, quando possível, a mais utilizada na prática devido sua facilidade de implementação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997).

Em CZE, a amostra é injetada no capilar preenchido com uma solução tampão, quando uma voltagem é aplicada os solutos migram em zonas em direção ao detector e são separados pela diferença na taxa de migração, que é dependente de suas mobilidades, característica intrínseca a eles. Portanto, para que a separação seja possível, os analitos devem estar em solução na forma de cátions ou ânions (BAKER, 1995).

1.6.2 Espectroscopia

As técnicas espectroscópicas são baseadas na interação da radiação eletromagnética com a matéria e desse modo, permitem a obtenção de informações sobre as funções químicas e a estrutura molecular do analito. Por suas propriedades, é amplamente utilizada na identificação e caracterização de substâncias (SALA, 2008; SMITH & DENT, 2005).

A espectroscopia é dividida em duas grandes classes, são estas, as técnicas que envolvem transferências de energia e as técnicas que não envolvem transferência de energia. No primeiro caso, em que se encontram as técnicas de absorção utilizadas neste presente trabalho, a energia é transferida entre um fóton de radiação eletromagnética e o analito, promovendo-o a um estado de mais alta energia, ou excitado.

Cada técnica espectroscópica está associada a um tipo de transferência energética e a uma região específica do espectro eletromagnético. As técnicas exploradas neste presente trabalho e suas características estão listadas a seguir (**Tabela 1**) (HARVEY, 2000).

Tabela 1 - Técnicas espectroscópicas explicitadas de acordo com a região correspondente do espectro eletromagnético.

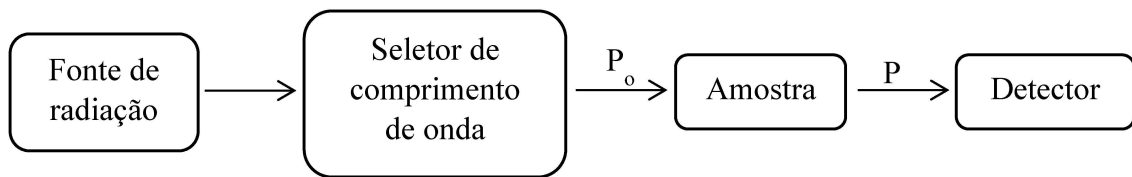
Tipo de transferência energética	Região do espectro eletromagnético	Técnica Espectroscópica
Absorção	UV-VIS	Absorção UV-VIS
	Infravermelho	Absorção Infravermelho Espalhamento Raman
	Radiofrequência	Ressonância Magnética Nuclear

Fonte: Adaptado de Harvey (2000).

Na espectroscopia de absorção, um feixe de radiação eletromagnética passa através de uma amostra. Nesse momento, grande parte da radiação é transmitida sem perda de intensidade, entretanto, em frequências selecionadas a intensidade da radiação é atenuada. Esse processo de atenuação é chamado de absorção (HARRIS, 2010; HARVEY, 2000).

Em relação à instrumentação, os sistemas consistem basicamente de componentes comuns. Uma fonte de energia, um dispositivo que seleciona a faixa de comprimento de onda que deve interagir com o analito, um detector e um processador do sinal (**Diagrama 1**) (HARVEY, 2000).

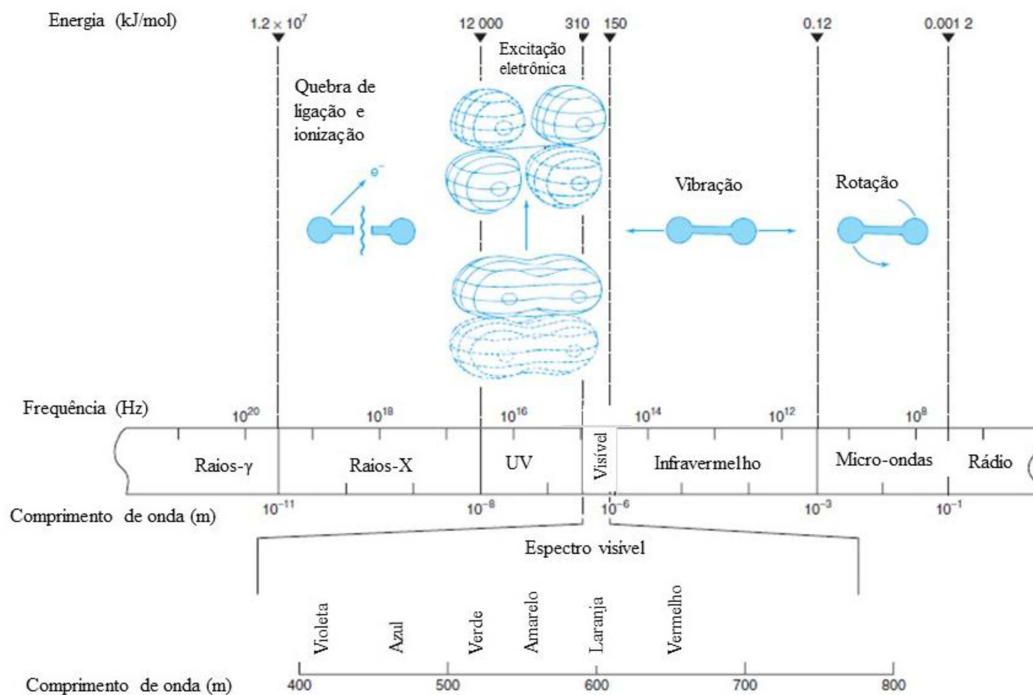
Diagrama 1 - Representação simplificada do processo de absorção de radiação eletromagnética.



Onde P_0 é a radiação incidente e P a radiação transmitida após interagir com o analito.
Fonte: Adaptado de Harris (2010).

Dois requisitos gerais devem ser atendidos para que o analito seja capaz de absorver a frequência da radiação eletromagnética fornecida pela fonte. Primeiramente, deve haver um mecanismo pelo qual o campo elétrico ou campo magnético, componentes da radiação eletromagnética, interaja com o analito. Cada uma das técnicas aqui citadas é decorrente de um fenômeno molecular distinto (**Figura 4**). Em segundo lugar, a energia da radiação deve ser exatamente igual à diferença (ΔE) entre dois estados de energia quantizados do analito (HARVEY, 2000).

Figura 4 - Espectro eletromagnético com representações dos fenômenos associados às técnicas espectroscópicas.



Fonte: Adaptado de Harris (2010).

A absorção na região do ultravioleta e visível (UV-VIS) corresponde a uma excitação dos elétrons de valência do analito. Quando uma molécula ou íon absorve essa radiação, sofre uma alteração na sua configuração eletrônica em que os elétrons migram para orbitais moleculares desocupados. Dentre essas transições, destacam-se as que envolvem os orbitais do tipo π , visto que estão relacionadas a grupos funcionais característicos de compostos orgânicos. Essas ligações e grupos funcionais que dão origem à absorção da radiação UV-VIS são chamados de cromóforos (HARVEY, 2000).

Em geral, a absorção UV-VIS é baseada na medida de transmitância (T) ou absorvância (A) de soluções. Esses valores são dependentes da absortividade molar do analito (ϵ), característica intrínseca das moléculas, do caminho óptico (b) e são proporcionais à concentração da solução (c) conforme a equação (1) (HARRIS, 2010; HARVEY, 2000; SKOOG *et al.*, 2007):

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = -\log T = \epsilon bc \quad (1)$$

Neste presente trabalho, a absorção UV foi utilizada como instrumento de detecção para os experimentos de Eletroforese Capilar, este que é equipado com um dispositivo de arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*). O DAD consiste de um circuito linear integrado de múltiplos detectores, ou canais, que permitem registrar o espectro completo de absorção do analito. Essa é uma ferramenta importante na identificação dos compostos (HARRIS, 2010; RAIMUNDO & PASQUINI, 1997).

A espectroscopia de absorção por Infravermelho (IV) (IR, do inglês *Infrared*) corresponde a uma mudança na energia vibracional de uma molécula ou íon poliatômico (HARVEY, 2000). Em geral, as frequências de vibração de um sólido estão localizadas na faixa do espectro eletromagnético correspondente a região da radiação infravermelha, o fato justifica a utilização dessa radiação em ensaios de caracterização de materiais no estado sólido (RODRIGUES & GALZERANI, 2012).

Tais modificações vibracionais são características de cada tipo de ligação presentes em compostos orgânicos, por exemplo, ligações simples carbono-carbono (C-C) absorvem radiação IV a uma energia mais baixa do que ligações duplas (C=C), ou seja, grupos funcionais apresentam frequências distintas de absorção. Dessa forma, o IV é uma excelente ferramenta para identificação e elucidação estrutural de compostos (HARVEY, 2000; PAVIA *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 2007).

Outra técnica baseada na modificação vibracional do analito, também explorada nesse trabalho, é o espalhamento Raman. No espalhamento Raman, a amostra é submetida a um feixe

de laser de alta potência e o espectro é gerado pela medida da radiação espalhada em um ângulo de 90° (RODRIGUES & GALZERANI, 2012; SKOOG *et al.*, 2007).

Os espectros gerados em análises por IV e por Raman se assemelham muito, no entanto, há diferenças suficientes entre os tipos de grupos funcionais que são ativos em cada uma delas, portanto, são consideradas técnicas complementares (SALA 2008; SKOOG *et al.*, 2007). Uma diferença importante entre essas técnicas, que se apresenta como uma vantagem do Raman em relação ao IV, é capacidade do Raman de analisar amostras hidratadas, visto que as frequências de vibrações da água não são registradas por esse tipo de espectroscopia (SKOOG *et al.*, 2007).

Por fim, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (NMR, do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*) é outra técnica amplamente utilizada para elucidação de estrutura molecular, também explorada neste trabalho. A técnica é baseada na medida de absorção do campo eletromagnético na região de rádio frequência (SKOOG *et al.*, 2007).

Em contraste com as demais técnicas espectroscópicas supracitadas, na RMN, são os núcleos atômicos que estão envolvidos na absorção da radiação. O fenômeno ocorre quando os núcleos alinhados com um campo magnético aplicado são induzidos a absorver energia e mudar a orientação do spin (PAVIA *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 2007).

A técnica oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do analito. Por exemplo, quando núcleos de hidrogênio (prótons) são analisados, é possível a determinação do número de cada um dos diferentes tipos de prótons não equivalentes, bem como, a obtenção de informações referentes à natureza do ambiente químico de cada próton. Núcleos de carbono também são amplamente utilizados (PAVIA *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 2007).

A combinação do RMN com as demais técnicas espectroscópicas abordadas é uma prática habitual entre os químicos e, muitas vezes, é suficiente para determinar a estrutura de uma molécula desconhecida, ou, no caso deste presente trabalho, verificar a pureza de compostos já conhecidos (PAVIA *et al.*, 2010).

1.6.3 Eletroanalítica

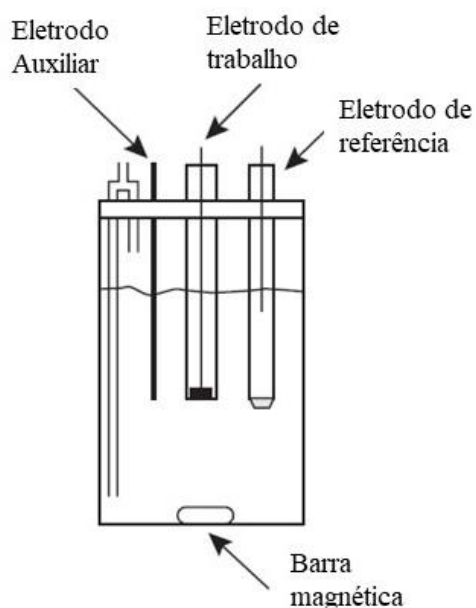
A eletroquímica, definida como a ciência que descreve interações entre química e eletricidade, analisa e descreve as transformações da matéria por mudanças de carga eletrônica quando perturbações, controladas por dispositivos elétricos, são submetidas ao meio. Tais transformações são chamadas de reações de oxidação-redução (LEFROU *et al.*, 2012). A

eletroanalítica, é o uso da eletroquímica aplicada à Química Analítica, e oferece um acesso singular a informações sobre sistemas químicos, bioquímicos e físicos (MONK, 2001; SCHOLZ, 2002).

Os métodos eletroanalíticos têm atraído crescente atenção na comunidade científica por suas vantagens sobre outros procedimentos analíticos (SKOOG *et al.*, 2007). Instrumentação de baixo custo, resposta rápida, excelente seletividade e alta sensibilidade fazem da eletroanalítica uma ótima opção para o desenvolvimento de metodologias direcionadas à determinação quantitativa de espécies químicas (BIAN *et al.*, 2019. SKOOG *et al.*, 2007).

A instrumentação necessária para o desenvolvimento dos experimentos aqui descritos consiste de uma célula eletrolítica com três eletrodos, são estes, um eletrodo auxiliar, também chamado de contra eletrodo, um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho. Todos estes imersos em uma solução, contendo o analito dissolvido e um eletrólito suporte, e conectados a um potenciostato (**Figura 5**) (SCHOLZ, 2002).

Figura 5 - Representação de uma célula eletrolítica tipicamente usada em voltametria.



Fonte: Adaptado de Harvey (2000).

O eletrodo de trabalho é aquele em que ocorre a reação de oxidação ou redução do analito, cujo potencial em relação ao eletrodo de referência varia linearmente com o tempo. O eletrodo de referência, por sua vez, tem um potencial que permanece constante durante o

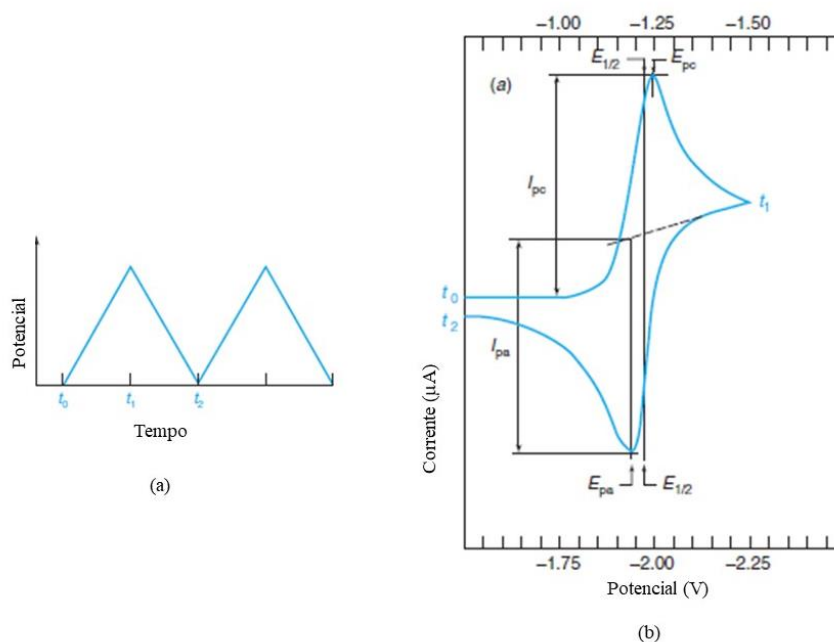
experimento. Na célula eletrolítica, a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar (HARRIS, 2010; SKOOG *et al.*, 2005).

Selecionada inicialmente para estudos exploratórios desenvolvidos no presente trabalho, a voltametria cíclica (VC) (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) oferece uma riqueza de informações experimentais sobre sistemas químicos (SCHOLZ, 2002). A análise dos dados obtidos através da técnica permite a compreensão de processos de transferência de elétrons, mecanismo e cinética de reações de oxirredução (ELGRISHI *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2013; SKOOG *et al.*, 2007; WANG, 2006).

Os métodos voltamétricos são baseados na medida da corrente gerada em função da aplicação de um potencial. Um gráfico corrente *versus* potencial aplicado é registrado, conhecido como voltamograma, e fornece informações sobre as reações que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho (HARVEY, 2000; SKOOG *et al.*, 2005).

Na voltametria cíclica, inicialmente é aplicado um potencial de onda triangular ao eletrodo de trabalho. Uma vez aplicado, é registrado no voltamograma um sinal de corrente catódica entre os tempos t_0 e t_1 . Em seguida, a corrente diminui, visto que o analito próximo à camada adjacente do eletrodo se esgota. Após t_1 , o potencial é revertido e, eventualmente, o produto reduzido inicialmente é oxidado. Essa porção do voltamograma gera um sinal de corrente anódica. Finalmente, à medida que o produto dessa etapa se esgota, a corrente anódica decai ao seu valor inicial. O ciclo pode ser repetido várias vezes (**Figura 6**) (HARRIS, 2010).

Figura 6 - Representação gráfica do potencial de onda triangular (a) e do voltamograma cíclico (b).



Onde, em (b), $E_{1/2}$ representa o potencial de meia-onda, E_{pa} o potencial de corrente anódica, E_{pc} o potencial de corrente catódica, I_{pc} e I_{pa} são as correntes onde esses potenciais são observados.

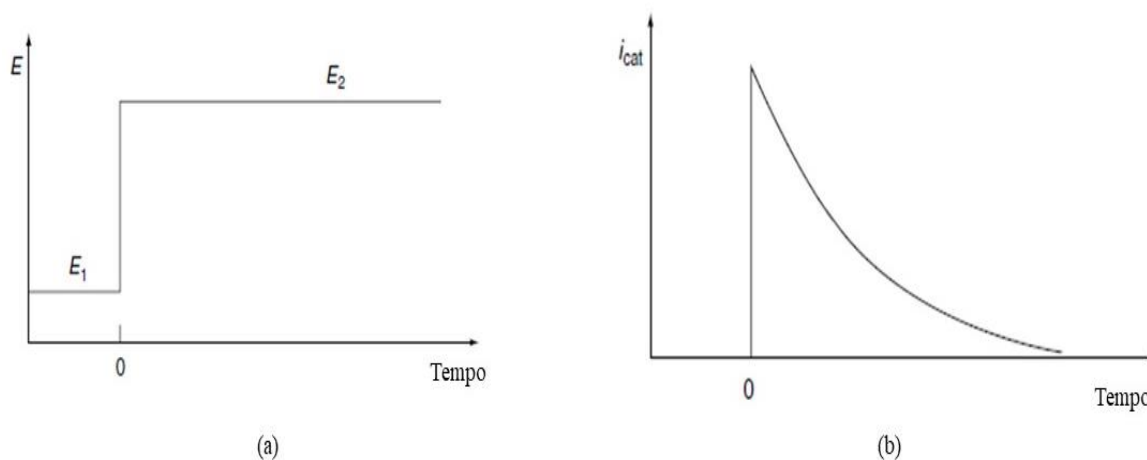
Fonte: Adaptado de Harris (2010).

Também utilizada neste trabalho, a cronoamperometria é uma técnica na qual um potencial constante é aplicado ao eletrodo de trabalho estacionário, inserido na célula eletrolítica sem agitação. É registrada a curva da corrente gerada em função do tempo, que expressa a mudança no gradiente de concentração nas proximidades da superfície do eletrodo (MONK, 2001; WANG, 2006).

Na cronoamperometria, o transporte de massa se dá apenas por difusão, em contraste com a amperometria por exemplo, técnica similar que também envolve o transporte por convecção em virtude da utilização de agitação durante obtenção dos dados. (MONK, 2001; WANG, 2006).

Durante o experimento de cronoamperometria, o potencial é aplicado inicialmente (E_1), onde nenhuma eletromodificação ocorre, até um segundo potencial (E_2), momento em que a reação é completa. A resposta é dada pela curva corrente *versus* tempo, que registra o rápido aumento de corrente inicial, e em seguida decresce suavemente à medida que o tempo avança (Figura 7) (MONK, 2001; WANG, 2006).

Figura 7 - Representação gráfica da aplicação de potencial vs tempo (a) e corrente vs tempo (b).



Fonte: Adaptado de Wang (2006).

Em geral, a cronoamperometria é adequada para a análise rápida de um único analito, submetendo-o à reação de oxidação ou redução. Métodos analíticos mediados por cronoamperometria são frequentemente usados para determinação de parâmetros instrumentais, testes de novos eletrodos modificados e estudos exploratórios diversificados (WANG, 2006). Além disso, há disponível na literatura especializada, diversas publicações que envolvem a técnica em análises químicas e bioquímicas com uma abordagem quantitativa.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de um estudo investigativo sobre métodos analíticos direcionados para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) desenvolvimento de estudo exploratório, usando diversas ferramentas analíticas, direcionado para avaliação da estabilidade química da hidroquinona;
- b) verificação da eventual presença de benzoquinona em formulações farmacêuticas cujo princípio ativo seja a hidroquinona;
- c) desenvolvimento de estudo exploratório direcionado a selecionar a abordagem analítica adequada para o doseamento;
- d) desenvolvimento e otimização de metodologia analítica, pela técnica selecionada, para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas.
- e) otimização do preparo de amostra;
- f) aplicação do método desenvolvido na análise de amostras de gel dermatológico contendo hidroquinona adquirido em farmácias locais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são descritos todos os materiais utilizados neste trabalho, são estes, reagentes, soluções e amostras.

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e padrões utilizados neste trabalho foram de grau analítico e a água purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, USA). Metanol grau UV/HPLC e hidróxido sódio P.A (NaOH) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido acético P.A (CH₃COOH), ácido fosfórico P.A (H₃PO₄), ácido bórico P. A. (H₃BO₃), dodecil sulfato de sódio, acetonitrila P.A. da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Dióxido de deutério (D₂O) e dimetilsulfóxido deuterado (C₂D₆OS) da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Padrões de hidroquinona e benzoquinona (*Pharmaceutical Secondary Standard (Certified Reference Material)*) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) exclusivamente para este trabalho. As soluções estoque individuais de hidroquinona 10 mmolL⁻¹ e de benzoquinona 10 mmolL⁻¹ foram preparadas no dia do uso em solvente adequado para cada experimento, são estas água deionizada ou solução tampão BR ajustado no pH de interesse.

A solução tampão BR (Britton-Robinson) de força iônica controlada é preparada a partir de ácido acético (CH₃COOH), ácido bórico (H₃BO₃) e ácido fosfórico (H₃PO₄) todos na concentração de 40 mmolL⁻¹ e água qsp (MONGAY & CERDA, 1974). As soluções, usadas nos experimentos por eletroforese capilar e eletroanalítica, foram ajustadas em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 com solução de NaOH 1 mmolL⁻¹.

Os géis dermatológicos contendo hidroquinona a 4 % (m/m), utilizados como amostra neste trabalho, foram adquiridas em farmácias tradicionais do município de Juiz de Fora, Minas Gerais. As bisnagas contendo o produto foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento da análise, conforme recomendação descrita no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012b).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção são descritos todos os procedimentos experimentais envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

3.2.1 Eletroforese Capilar

Os experimentos por eletroforese capilar foram realizados em equipamento Agilent modelo 7100 CE (Palo Alto, Califórnia, EUA) equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e *software* de aquisição e tratamento de dados ChemStation (A.06.01), disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Em todos os experimentos mediados por eletroforese capilar, a temperatura do cartucho foi mantida a 25 °C e o sistema operado sob polaridade normal com aplicação de voltagem constante de +20 kV, e injeção hidrodinâmica a 50 mbar por 5 s. Foi utilizado capilar de sílica fundida revestido de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com comprimento total de 48,5 cm e 40,0 cm de comprimento efetivo, 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo.

As soluções analisadas, o modo de eletroforese, os parâmetros de detecção e os eletrólitos (BGE, do inglês *Background Electrolyte*) utilizados em cada experimento são descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Descrição das condições experimentais dos experimentos por eletroforese capilar.

Exp.	Modo de CE / Detecção	Analitos	BGE
(a)	CZE-UV $\lambda = 287 \text{ nm}$	I. Hidroquinona 10 mmolL^{-1} em água. II. Metanol.	30 mmolL^{-1} de tampão Tris/Fosfato pH 8.
(b)	MEKC-UV $\lambda = 287 \text{ nm}$	Hidroquinona 2 mmolL^{-1} em 10 % (v/v) de metanol e água qsp.	20 mmolL^{-1} de tampão Tris/Fosfato pH 8 e 40 mmolL^{-1} de SDS em 10 % (v/v) de acetonitrila.
(c)	CZE-UV $\lambda = 287 \text{ nm}$	I. Hidroquinona 2 mmolL^{-1} em água. II. Metanol.	Tampão BR ajustado individualmente em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12
(d)	CZE-UV $\lambda = 248 \text{ nm}$	I. Benzoquinona 2 mmolL^{-1} em água. II. Metanol.	Tampão BR ajustado individualmente em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12
(e)	MEKC-UV $\lambda = 248 \text{ nm}$ e 287 nm	Hidroquinona 5 mmolL^{-1} em 10 % (v/v) de metanol e água qsp.	20 mmolL^{-1} de tampão Tris/Fosfato pH 7,5 e 40 mmolL^{-1} de SDS em 10 % (v/v) de acetonitrila.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Todas as soluções com ajuste de pH foram verificadas em pHmetro digital Digimed modelo DM-22.

Ao ser utilizado um novo capilar, este foi submetido a um condicionamento total de 70 min, dividido em 30 min de NaOH 1 molL^{-1} , 20 min de água deionizada e 20 min do eletrólito de trabalho.

No início das análises em cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado com solução de NaOH 1 molL^{-1} por 15 min, água deionizada por 10 min e eletrólito por 10 min. O condicionamento entre as análises foi realizado pela passagem de 2 min de NaOH 1 molL^{-1} , 2 min de água deionizada e 2 min de eletrólito.

3.2.2 Espectroscopia de absorção Ultravioleta

Todos os espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) foram obtidos experimentalmente a partir do sistema de detecção por arranjo de diodos inerente ao equipamento de eletroforese capilar. O espectro teórico de absorção UV da hidroquinona foi obtido através do banco de dados espectral Bio-Rad Sadtler disponível no *software* KnowItAll®.

3.2.3 Espectroscopia Raman

Os experimentos foram realizados em Espectrofotômetro FT-Raman BRUKER com radiação excitante 1064 nm, modelo RFS-100/S e *software* de aquisição OPUS, disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para os testes, os produtos a serem analisados foram transferidos para o porta-amostra adequado sem tratamento prévio.

3.2.4 Espectroscopia de absorção no Infravermelho

Os experimentos foram realizados em equipamento FT-IR BRUKER modelo ALPHA MB 102 com acessório ATR (*Attenuated Total Reflectance*) e *software* de aquisição OPUS, disponível do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para os testes, os padrões de hidroquinona e benzoquinona em fase sólida foram posicionados adequadamente no equipamento sem tratamento prévio.

3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros DE RMN ^1H e ^{13}C em solução foram obtidos no espectrômetro BRUKER AVANCE III 500 MHz. Os espectros de RMN ^{13}C em fase sólida foram obtidos no espectrômetro BRUKER AVANCE III HD 300 75 MHz, ambos disponíveis no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para todos os testes em solução foram pesados individualmente 10 mg de hidroquinona e 10 mg de benzoquinona e ambos solubilizados em 500 μL do solvente de interesse em temperatura ambiente, são estes D_2O e DMSO-d_6 .

Nos testes em fase sólida, 20 mg de cada substância foi misturada com 80 mg sílica e prensada em rotor de zircônia 4 mm mantido a 10 kHz de rotação durante o procedimento, o espectro foi gerado com a obtenção de 4096 *scans*.

3.2.6 Métodos Eletroanalíticos: Estudos exploratórios

Todos experimentos mediados por técnicas eletroanalíticas foram realizados através de um potenciostato AUTOLAB modelo 128N e *software* de aquisição e tratamento de dados NOVA 2.1.3, bem como o Microsoft Office Excel 2016 e o Origin 8.0, disponível no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Em todas as análises foram utilizados um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina.

3.2.6.1 Voltametria cíclica

Os experimentos mediados por voltametria cíclica foram realizados a partir da adição de alíquotas do analito à célula eletrolítica contendo o eletrólito suporte. Em todas análises, foi utilizado a solução tampão BR, preparada de acordo com o descrito na seção 3.1. Após adição do analito, a solução permaneceu sob agitação durante cerca de 20 segundos a 550 rpm. Em seguida, foi iniciada a aplicação do potencial, em todos, a uma velocidade de 100 mVs⁻¹.

Em ensaios com adição de alíquotas múltiplas à célula eletrolítica, a solução foi mantida em agitação por cerca de 20 segundos antes de cada aplicação de potencial. Já em ensaios com diferentes níveis de pH, uma nova célula eletrolítica foi preparada a cada nível, e o procedimento seguiu conforme descrito. As condições experimentais particulares são descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Condições experimentais dos ensaios por voltametria cíclica.

Exp.	pH	Volume eletrólito	Padrão adicionado	Alíquota	Intervalo inicial de potencial (V)	Intervalo de potencial no sentido inverso (V)
(a)	2,4,6,8,10,12	2 mL	HQ 10 mmol L ⁻¹	Uma adição de 200 µL em cada pH	-0,7 a 0,9	0,9 a -0,7
(b)	2,4,6,8,10	2 mL	HQ 10 mmol L ⁻¹	Uma adição de 200 µL em cada pH	0,9 a -0,4	-0,4 a 0,9
(c)	2,4,6,8,10	2 mL	BQ 10 mmol L ⁻¹	Uma adição de 200 µL em cada pH	-0,4 a 0,9	0,9 a -0,4
(d)	5,5	2 mL	HQ 10 mmol L ⁻¹	Uma adição de 200 µL	0,9 a -0,4	-0,4 a 0,9
(e)	5,5	2 mL	HQ 10 mmol L ⁻¹	Uma adição de 200 µL	0 a -0,4	-0,4 a 0,9
(f)	5,5	5 mL	HQ 10 mmol L ⁻¹ e BQ 1 mmol L ⁻¹	Uma adição de 30 µL de HQ e 5 adições sucessivas de 15 µL de BQ	0 a -0,4	-0,4 a 0,9

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.2.6.2 Determinação dos coeficientes de difusão

Os experimentos referentes ao cálculo do coeficiente de difusão de cada analito, são estes, a hidroquinona e a benzoquinona, foram realizadas em duas etapas. Primeiramente, para determinação da área da superfície do eletrodo de trabalho, uma solução de ferricianeto de potássio foi adicionada à célula eletrolítica contendo o eletrólito suporte. Após agitação de cerca de 20 segundos a 550 rpm, foi aplicado um intervalo de potencial em diferentes velocidades de varredura para registro do voltamograma cíclico.

Em seguida, soluções aquosas de hidroquinona e benzoquinona foram submetidas ao mesmo procedimento para determinação dos respectivos coeficientes de difusão. Os parâmetros experimentais e demais condições das duas etapas são descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Parâmetros experimentais do procedimento para determinação dos coeficientes de difusão da hidroquinona e da benzoquinona.

Etapas	Concentração do analito	Eletrólito suporte	Velocidades de varredura	Potencial aplicado
(a) Determinação da área do eletrodo	Ferricianeto de potássio 1 mmolL ⁻¹	KCl 100 mmolL ⁻¹	25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mVs ⁻¹	-0,2 a 0,7 V
(b) Determinação coeficiente de difusão	Hidroquinona 0,697 μmolL ⁻¹	Solução tampão Br pH 7	25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mVs ⁻¹	-0,7 a 0,9 V
	Benzoquinona 0,385 μmolL ⁻¹	Solução tampão Br pH 7	25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mVs ⁻¹	0,9 a -0,7 V

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

3.2.6.3 Cronoamperometria

Uma alíquota de 200 μL de hidroquinona 10 mmolL⁻¹ preparada em água foi adicionada à célula eletrolítica contendo 7 mL da solução tampão BR ajustado em pH 5,5. Em seguida, foram feitas 10 adições sucessivas de 20 μL de benzoquinona 0,01 mmolL⁻¹. Antes de cada

leitura, a solução permaneceu em agitação por 20 s a 550 rpm. A análise foi então feita pela aplicação de um potencial fixo em $-0,1$ V por 20 segundos.

3.2.7. Análises quantitativas

Nos ensaios quantitativos, todos realizados por cronoamperometria, a cada adição do analito à célula eletrolítica contendo o eletrólito suporte, a solução foi mantida em agitação e em seguida foi submetida à análise. Os parâmetros otimizados utilizados nesses experimentos são descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Parâmetros experimentais otimizados para as análises quantitativas por cronoamperometria.

Potencial aplicado	0,4 V
Tempo de análise	20 s
Tempo de agitação	20 s a 550 rpm
Eletrólito suporte	Solução tampão BR pH 5,5

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Nesta etapa, bem como nas etapas subsequentes, também foram utilizados um eletrodo de trabalho de carbono vítreo, um eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Assim como, os demais instrumentos necessários descritos na seção 3.2.6.

3.2.8. Parâmetros de desempenho analítico

Os procedimentos experimentais referentes à obtenção dos dados para determinação dos parâmetros de desempenho analítico são descritos a seguir.

3.2.8.1 Seletividade

Inicialmente, 40 mg da matriz do gel dermatológico, preparado conforme descrito na seção 3.2.10, foi pesado e solubilizado, com auxílio de banho ultrassônico, em 2 mL do solvente de extração, este sendo a solução tampão BR pH 5,5 e 10 % (v/v) de metanol. Após o procedimento, uma alíquota de 35 μ L foi adicionada à célula eletrolítica contendo 7 mL do

eletrólito suporte. Em seguida, a solução foi submetida à análise por cronoamperometria a partir das condições otimizadas descritas na seção 3.2.7.

À mesma célula foram adicionadas sucessivamente 5 alíquotas de 20 μL de hidroquinona 10 mmolL^{-1} previamente solubilizado no eletrólito suporte. A cada nova adição, foi seguido o procedimento otimizado descrito na seção 3.2.7.

3.2.8.2 Linearidade

Oito alíquotas de 20 μL de hidroquinona 10 mmolL^{-1} previamente solubilizada em tampão BR pH 5,5 foram adicionadas à célula eletrolítica contendo 7 mL do eletrólito suporte e mantida em agitação. A cada nova adição, foi seguido o procedimento de análise a partir dos parâmetros otimizados conforme descrito na seção 3.2.7.

3.2.8.3 Exatidão

Três réplicas autênticas de 40 mg de amostra do gel dermatológico foram pesadas e, a cada uma delas, foram adicionados respectivamente 200 μL , 400 μL e 600 μL de hidroquinona 10 mmolL^{-1} solubilizado em tampão BR pH 5,5. Em balão de 2 mL, o volume foi completado com o solvente de extração, e solubilizado com auxílio de banho ultrassônico. As análises foram realizadas em triplicata conforme procedimento otimizado descrito na seção 3.2.7.

3.2.9 Preparo e análise da amostra

As amostras foram preparadas pela pesagem de 40 mg do gel dermatológico contendo hidroquinona e solubilizado em 2 mL do solvente de extração, com auxílio de banho ultrassônico. Uma vez otimizado o solvente de extração, a solubilização do gel foi feita em solução tampão BR ajustado em pH 5,5 e 10% (v/v) de metanol, também com auxílio de banho ultrassônico. O procedimento foi realizado para o preparo de triplicatas autênticas.

Cada réplica foi analisada também em triplicata. Para isso, três alíquotas sucessivas de 35 μL da amostra foram adicionadas à célula eletrolítica contendo 7 mL do eletrólito suporte. A cada alíquota adicionada, a solução foi submetida à análise por cronoamperometria de acordo com as condições otimizadas descritas na seção 3.2.7.

3.2.10 Preparo da matriz do gel dermatológico

Todos os reagentes utilizados nesta etapa foram cedidos pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. A base do gel foi preparada pela diluição de 1,5 % (m/m) Carbopol 940® em 1,0 % (m/m) de propilenoglicol e água deionizada qsp. A mistura foi mantida em repouso por 24 h para hidratação do polímero.

Em seguida, um grama do gel foi pesado e a ele adicionados os excipientes listados na bula dos géis dermatológicos em análise. São estes, 0,3 % (m/m) de metilparabeno, 1,0 % (m/m) de matabissulfito de sódio, 0,1 % (m/m) de edetato dissódico (EDTA) e 0,1 % (m/m) de trometamol. Com exceção do trometamol, que não consta no documento, os percentuais descritos foram baseados no *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE *et al.*, 2009).

O material preparado foi mantido em temperatura ambiente ao abrigo de luz, conforme recomendação descrita no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012b).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção estão descritos os resultados e as discussões pertinentes deste trabalho.

4.1 ELETROFORESE CAPILAR

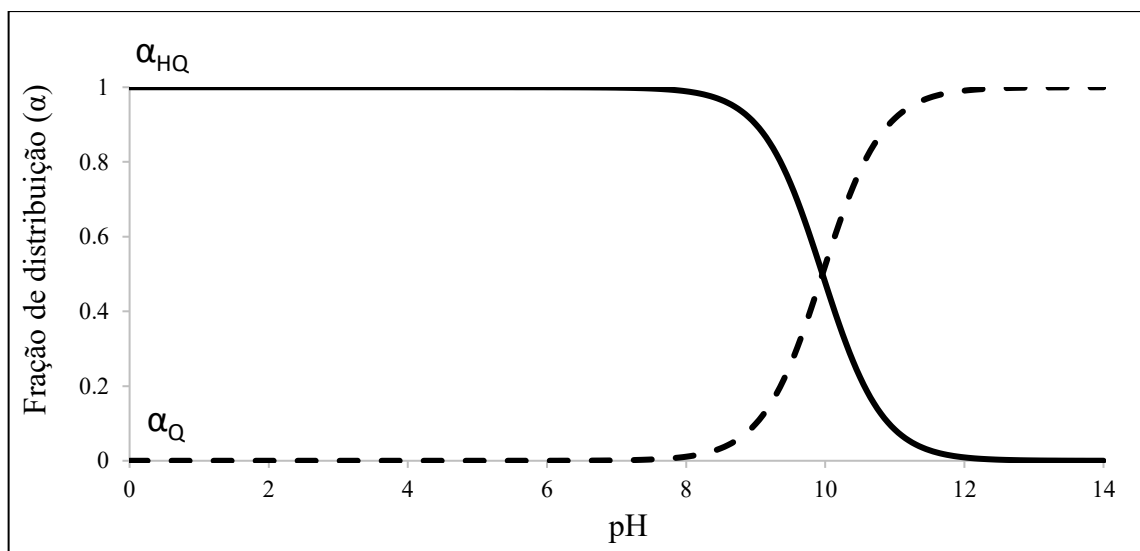
A fim de selecionar uma técnica analítica adequada para o desenvolvimento de uma metodologia para o doseamento de hidroquinona em formulações farmacêuticas, foi proposto inicialmente a elaboração de testes envolvendo o uso da eletroforese capilar. Dentre os modos de operação disponíveis da CE, os primeiros experimentos foram direcionados para verificação da possibilidade do uso da eletroforese capilar de zona (CZE), em virtude de suas vantagens práticas, descritas na seção 1.6.1.

A primeira etapa do desenvolvimento de uma metodologia por CZE é a determinação do pH em que o analito se apresenta na forma carregada, seja cátion ou ânion. Para isso, sabendo que o pKa da hidroquinona é 9,96 (PUBCHEM, 2019a), foi construído seu diagrama de distribuição como uma ferramenta teórica inicial para avaliar o comportamento da espécie (**Diagrama 2**).

A fração de distribuição descreve a composição de uma solução em função do pH. A partir do diagrama é possível prever o quanto de cada forma química do equilíbrio em estudo há em solução, essas concentrações relativas são chamadas de coeficiente alfa. A partir da combinação da constante de equilíbrio com o balanço de massa do mesmo, temos as equações (2) e (3), que representam os coeficientes alfa de cada espécie (HARRIS, 2010; SKOOG *et al.*, 2005):

$$\alpha_{\text{HQ}} = \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{pKa}}} \quad (2)$$

$$\alpha_{\text{Q}} = \frac{10^{-\text{pKa}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{pKa}}} \quad (3)$$

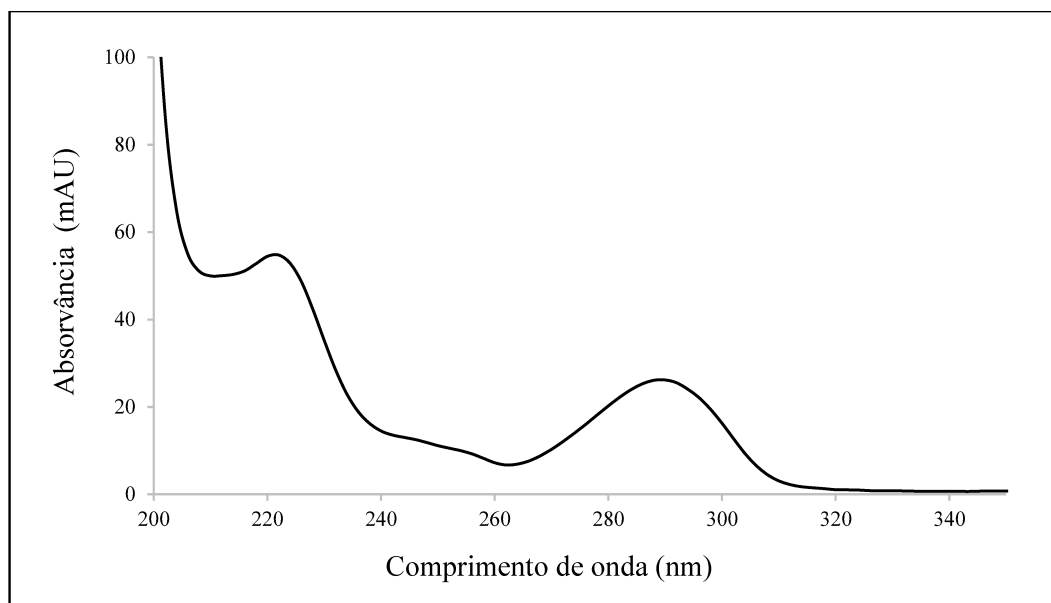
Diagrama 2 - Distribuição da hidroquinona ao longo da escala de pH.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A hidroquinona possuiu duas hidroxilas ligadas diretamente ao anel benzênico, semelhante a estrutura do fenol, com apenas uma hidroxila. Portanto, deve apresentar carácter ácido. Nessas condições, esperava-se que com o aumento da alcalinidade do meio, ocorresse a formação de espécies carregadas, sobretudo na proximidade pKa da substância.

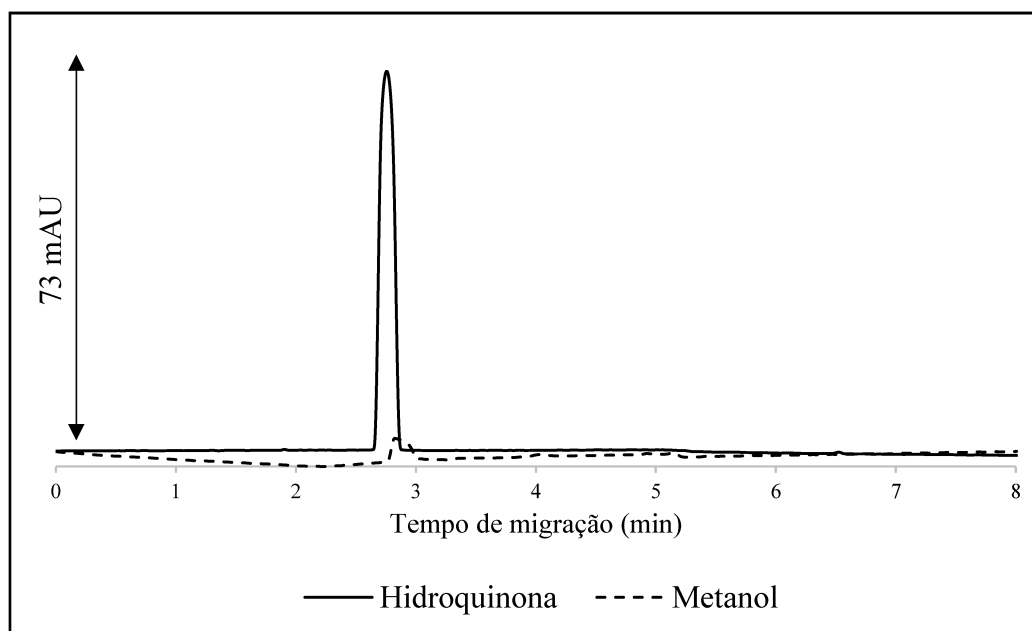
Dessa forma, de acordo com o diagrama de distribuição elaborado (**Diagrama 2**), a partir de pH próximo a 8 poderia ser observada a desprotonação da molécula. Sendo este o caso, um possível método de quantificação por CZE poderia ser desenvolvido. Diante deste resultado, uma análise qualitativa foi realizada por CZE com detecção UV com a finalidade de verificar a viabilidade do uso da técnica.

Para isso, uma vez escolhido o pH, selecionou-se a priori, um eletrólito composto por solução tampão Tris/Fosfato, conforme descrito no item (a) da Tabela 2 encontrada na seção 3.2.1. O comprimento de onda utilizado para detecção foi de 287 nm, previamente determinado pelo espectro de absorção UV obtido experimentalmente, conforme descrito na seção 3.2.2 (**Figura 8**).

Figura 8 - Espectro de absorção ultravioleta da hidroquinona.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Os demais parâmetros instrumentais referentes ao CE foram baseados em metodologia desenvolvida por Lin e colaboradores (2007), também descrito na seção 3.2.1. O eletroferograma resultante é explicitado na (**Figura 9**).

Figura 9 - Eletroferograma da hidroquinona a 10 mmolL^{-1} por CZE-UV.

Condições experimentais: eletrólito composto por 30 mmolL^{-1} de tampão Tris/Fosfato pH 8, capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e $375 \mu\text{m}$ de diâmetro externo. Injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5 s, voltagem 20 kV, temperatura do cartucho $25 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em 287 nm.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

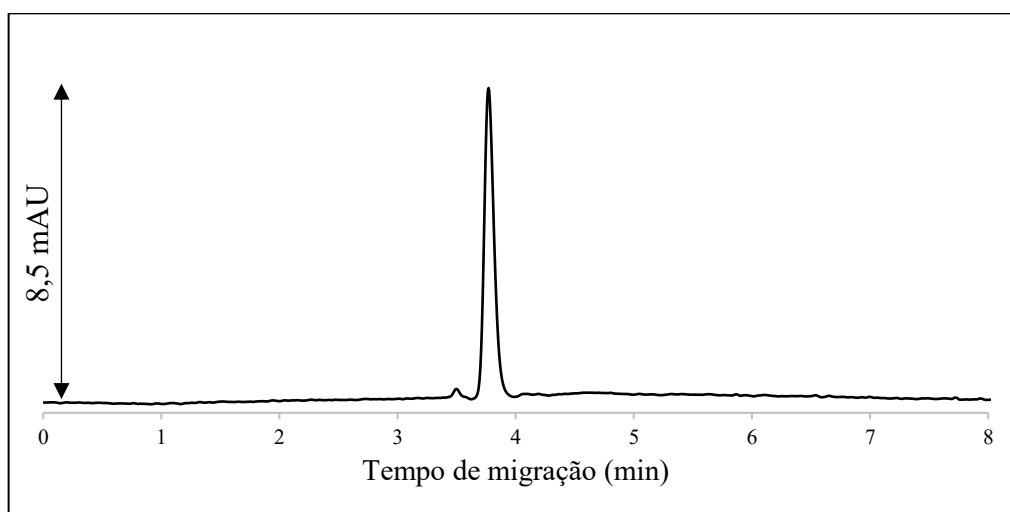
Observa-se no eletroferograma gerado o aparecimento do sinal referente a hidroquinona, confirmado pelo espectro de absorção UV associado ao sinal, que apresentou o mesmo perfil de absorção ao espectro indicado na figura 10. No entanto, quando comparado seu tempo de migração ao tempo de migração do metanol, nota-se que não há diferenças significativas.

O objetivo da análise de metanol nas mesmas condições, foi gerar um eletroferograma com um sinal que indique o tempo de migração do EOF. Visto que o pKa do metanol é 15,3 (PUBCHEM, 2019b), sabe-se que o mesmo se mantém na forma neutra em toda a faixa de pH de 0 a 14 e, devido a isso, é amplamente utilizado como marcador de fluxo eletroosmótico (HANCU *et al*, 2013).

Compostos carregados tendem a migrar em direção ao eletrodo de carga oposta. Em contrapartida, espécies neutras não são influenciadas pelo campo elétrico aplicado, logo, se movem pelo capilar com a mesma velocidade do fluxo eletroosmótico (BAKER, 1995). Consequentemente, acredita-se que nessas condições a hidroquinona ainda permanece em sua forma neutra.

Considerando a possibilidade de a hidroquinona não estar em ionizada como previsto, o mesmo experimento foi realizado por cromatografia eletrocínética micelar capilar (MEKC) a fim de verificar tal suposição. Para isso, foi adicionado uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) ao eletrólito usado anteriormente, conforme descrito no item b da Tabela 2 encontrada na seção 3.2.1. Demais condições experimentais foram mantidas, de acordo com o procedimento também descrito na seção 3.2.1. O resultado é mostrado na (**Figura 10**).

Figura 10 - Eletroferograma da hidroquinona a 2 mmolL^{-1} em 10 % (v/v) de metanol por MEKC-UV.



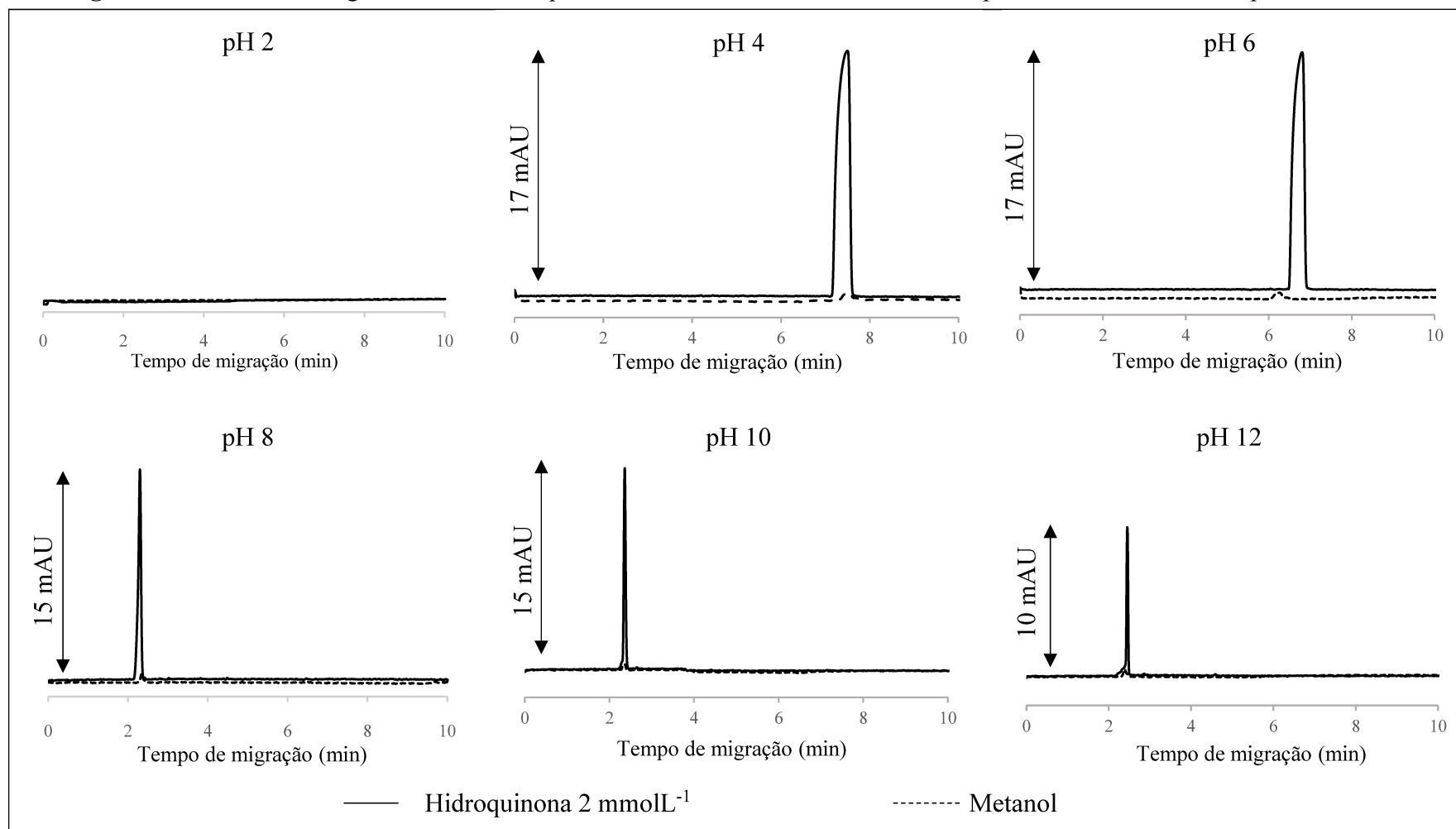
Condições experimentais: eletrólito composto por 20 mmolL^{-1} de tampão Tris/Fosfato pH 8 e 40 mmolL^{-1} de SDS em 10 % de acetonitrila capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), $75 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro interno e $375 \text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro externo. Injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5 s, voltagem 20 kV, temperatura do cartucho $25 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em 287 nm.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Diferente do teste realizado por CZE, o uso tensoativos permitiu a verificação da separação dos sinais da hidroquinona e do EOF, ou seja, a interação da hidroquinona com as micelas promoveu a separação. Tal resultado sugere que, de fato, em pH 8 a hidroquinona permanece em solução na forma neutra. Ou seja, conclui-se que nessas condições o uso da CZE torna-se inviável, uma vez que não foram encontradas espécies carregadas em solução.

De modo a avaliar o comportamento da hidroquinona de forma abrangente e verificar a possível presença de uma espécie carregada, novos experimentos mediados por CZE foram realizados em diferentes níveis de pH. Nesse caso, também foi injetado metanol nas mesmas condições para uma análise comparativa de seus tempos de migração, conforme o item (c) da Tabela 2 encontrada na seção 3.2.1. Demais condições também são descritas no item 3.2.1 e os resultados sumarizados na **Figura 11**.

Figura 11 - Eletroferogramas da hidroquinona 2 mmolL⁻¹ e do metanol em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 por CZE-UV.



Condições experimentais: eletrólito composto por tampão BR ajustado ao pH correspondente de cada análise. Capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), 75 μ m de diâmetro interno e 375 μ m de diâmetro externo. Injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5 s. Voltagem: 20 kV. Temperatura: 25 °C. Detecção em 287 nm.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Observa-se na figura 13 que, exceto o eletroferograma registrado em pH 2, os picos associados à hidroquinona e ao metanol apresentam o mesmo tempo de migração. Como descrito anteriormente, o metanol percorre o capilar com a mesma velocidade do EOF, comparativamente, conclui-se que a hidroquinona também migra junto ao EOF, o que a caracteriza como um composto neutro em todo intervalo de pH estudado.

Além disso, é interessante observar que à medida que o meio se torna mais alcalino, menor são os tempos de migração das duas espécies avaliadas. Isto ocorre porque o pH do eletrólito exerce significativa influência sob o EOF (BAKER, 1995).

A velocidade do EOF está relacionada a constante dielétrica (ϵ) e a viscosidade (η) da solução tampão, ao potencial zeta (ζ) e ao campo elétrico (E) aplicado ao sistema, conforme a equação (4) (BAKER, 1995).

$$V_{EOF} = (\epsilon\zeta/\eta)E \quad (4)$$

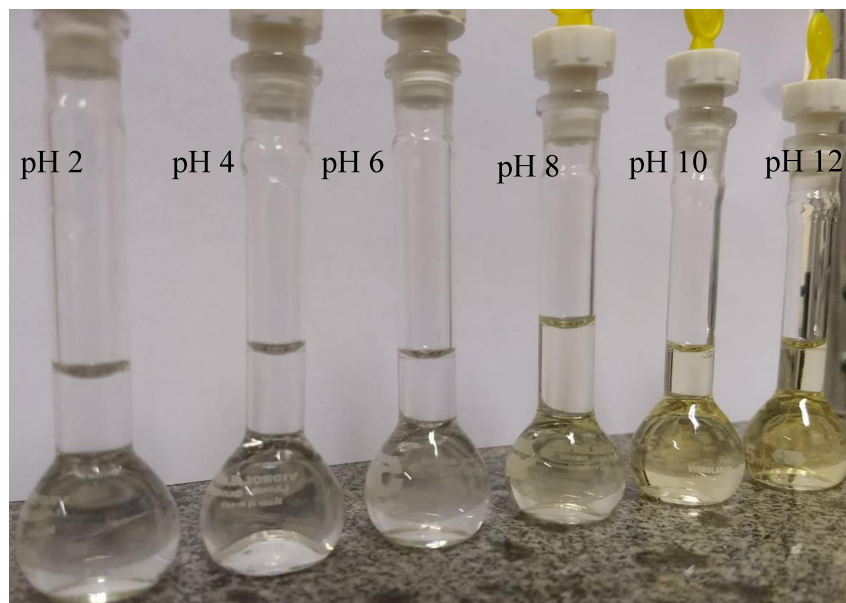
O potencial zeta, que expressa a magnitude da repulsão ou atração eletrostática de cargas, é determinado pela carga na superfície interna do capilar. Como a ionização dos grupos silanóis é diretamente dependente do pH, em meio alcalino onde os grupos silanóis estão mais desprotonados, maior é a magnitude do EOF. Analogamente, em meio ácido os grupos silanóis estão pouco ionizados, portanto menor é a magnitude do EOF (SPUDEIT *et al.*, 2012).

É devido a isso a variação nos tempos de migração das espécies nos diferentes níveis de pH estudados. Em meio fortemente ácido, como em pH 2, o EOF é praticamente inexistente, portanto, nenhuma espécie chega ao detector. À medida que a alcalinidade do meio aumenta, menores são os tempos de migração das espécies, isto é mais um indicativo que a hidroquinona permanece em sua forma original, uma vez que acompanha a velocidade do EOF.

Desse modo, os resultados explicitados evidenciaram que a espécie a hidroquinona permanece neutra em toda faixa de pH em estudo. Descartada a possibilidade de espécies carregadas, acredita-se que o diagrama de distribuição construído, apesar do parâmetro requerido seja a constante de dissociação, parece descrever teoricamente a relação do pH com a reação de oxidação da hidroquinona a benzoquinona.

Esse comportamento é observado pela modificação da cor da solução de acordo com o pH (**Figura 12**). A hidroquinona em solução é incolor e quando oxidada modifica sua coloração para amarelo (DRAELOS *et al.*, 2010). Observa-se na imagem, que a partir de pH 8 já é possível observar mudanças na coloração, indicativo de oxidação. Nota-se que a variação na coloração acompanha o perfil do diagrama de distribuição, assim sendo, esta ferramenta foi descartada como objeto de simulação de condições experimentais para CZE.

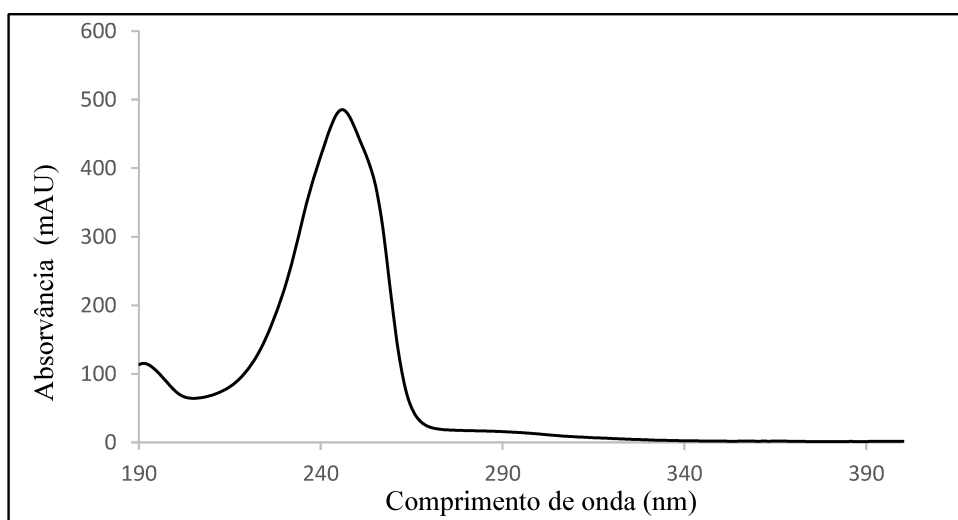
Figura 12 - Coloração das soluções de hidroquinona de acordo com variação no pH.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

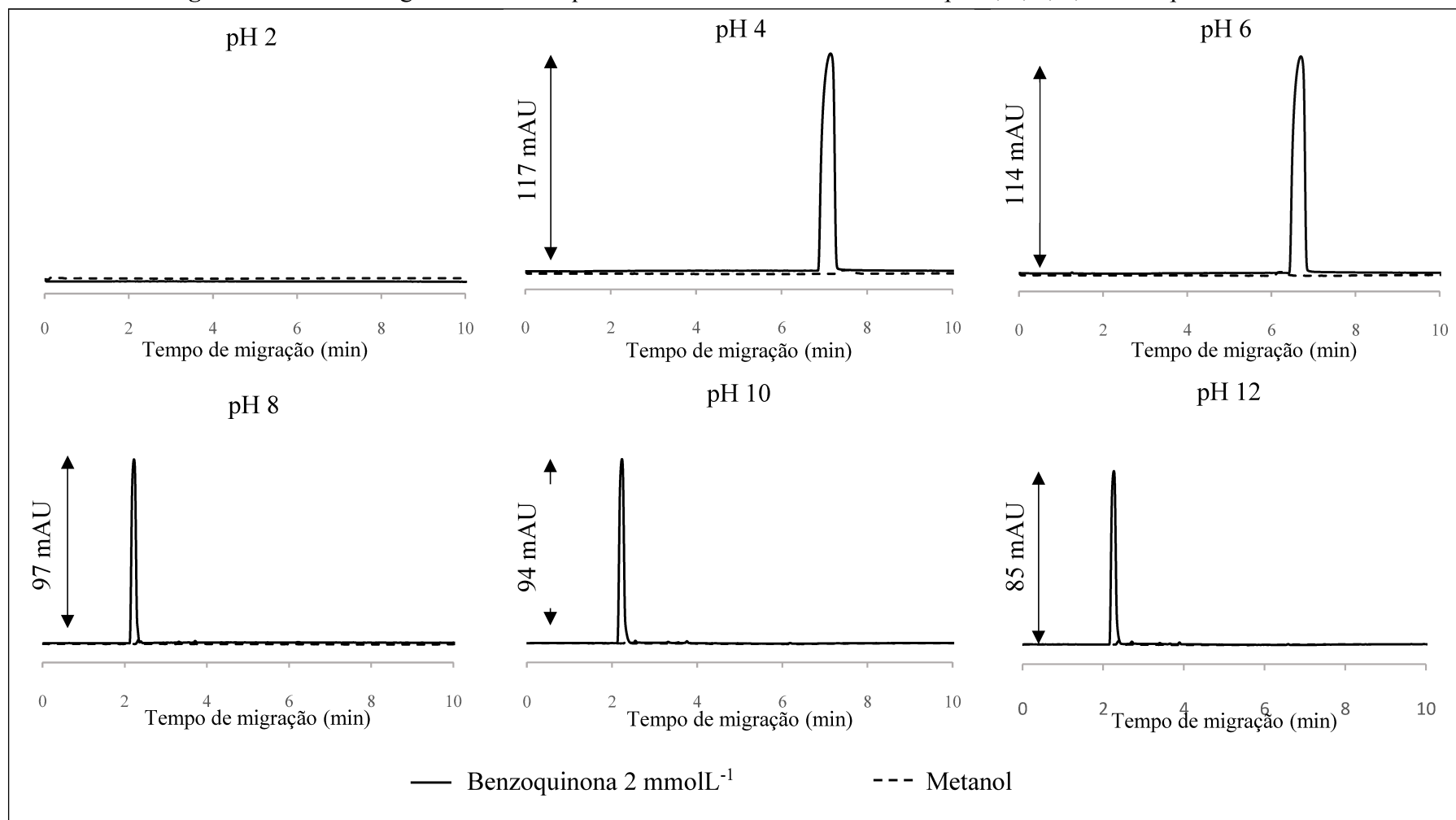
Diante desses resultados, a fim de monitorar o comportamento da benzoquinona e compará-lo com a hidroquinona, foram realizados os experimentos qualitativos por CZE nas mesmas condições anteriores (**Figura 14**). As condições experimentais são descritas no item (d) da Tabela 2 da seção 3.2.1, o procedimento completo também é descrito na seção 3.2.1. O comprimento de onda selecionado para as análises foi 248 nm, também determinado previamente pelo espectro de absorção UV obtido experimentalmente, conforme item 3.2.2 (**Figura 13**).

Figura 13 - Espectro de absorção ultravioleta da benzoquinona.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 14 - Eletroferograma da benzoquinona 2 mmolL^{-1} e do metanol em pH 2, 4, 6, 8, 10 e 12 por CZE-UV.



Condições experimentais: eletrólito composto por tampão BR ajustado ao pH correspondente de cada análise. Capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. Injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5 s. Voltagem: 20 kV. Temperatura: 25 °C. Detecção em 248 nm.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Observa-se nos eletroferogramas da Figura 16 que a benzoquinona exibe o mesmo comportamento da hidroquinona frente as modificações do meio reacional, ou seja, também acompanha o tempo de migração do EOF, marcado pelo metanol. Esse resultado já era esperado, visto que é bem estabelecido que quinonas são espécies químicas neutras e sofrem protonação com dificuldade (SOUSA *et al.*, 2016).

Embora alguns autores descrevam que em pH acima de 11 são encontrados monônions e até diânions em solução (MONKS *et al.*, 1992; GAMBOA-VALERO *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2016), o estudo realizado sugere que não há espécies carregadas, ou se existirem, não são suficientemente estáveis e/ou não estão em concentração suficiente para serem analisadas por eletroforese capilar.

Por fim, observa-se ainda que a principal diferença entre os sinais da hidroquinona e da benzoquinona é a intensidade. Como esperado, quando comparado a hidroquinona, os sinais registrados para a benzoquinona têm maior magnitude, devido a maior absorvidade da espécie.

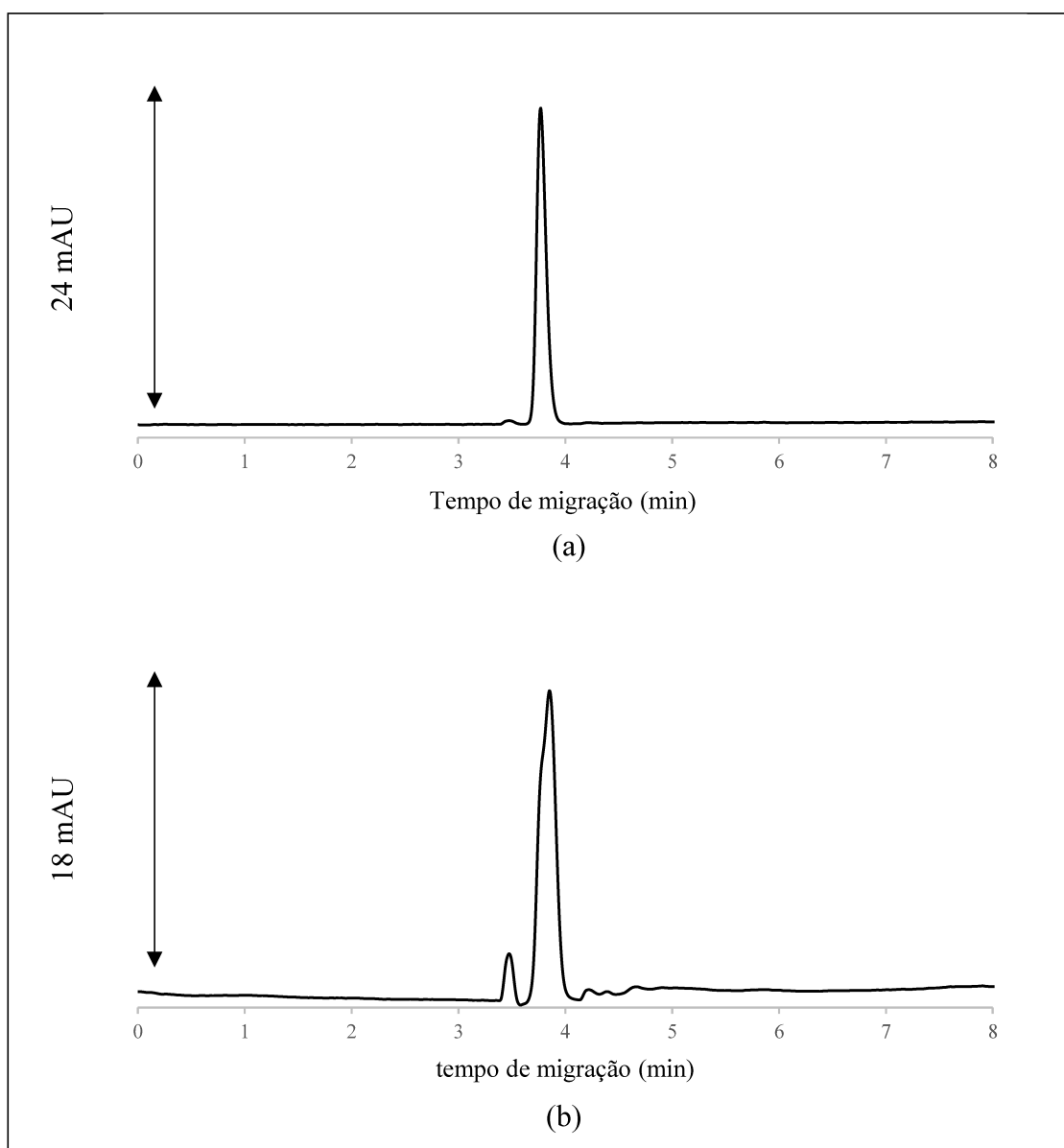
Os resultados obtidos até o momento mostraram que o desenvolvimento de uma metodologia simples por CZE é inviável, uma vez que não foram encontradas evidências de espécies carregadas em solução. No entanto, ainda na tentativa de utilizar a eletroforese capilar como ferramenta analítica para o doseamento de hidroquinona, optou-se por dar prosseguimento aos testes mediados por MEKC e verificar sua viabilidade para tal.

Visto que os testes exploratórios anteriores indicaram que a partir de pH 8,0 já é evidenciada a oxidação da hidroquinona, optou-se inicialmente por ajustar a solução tampão Tris/Fosfato em pH 7,5. Esse valor de pH foi selecionado a priori considerando não só a oxidação do analito, bem como o modo operacional da CE, uma vez que em meio ácido a MEKC é dificultada em virtude da baixa magnitude do EOF.

Como forma de acompanhar se de fato não está havendo a oxidação neste pH, os experimentos foram monitorados nos comprimentos de onda de máxima absorção das duas espécies em estudo. Bem como, foram configurados para registrar o espectro de absorção UV de todos os sinais do eletroferograma.

As condições experimentais estão descritas no item (e) da Tabela 2 da seção 3.2.1, o procedimento completo são descritas também no item 3.2.1. Os resultados são explicitados na **Figura 15**.

Figura 15 - Eletroferogramas da hidroquinona 5 mmolL^{-1} em 10% (v/v) metanol obtidos em (a) 287 nm e (b) 248 nm.

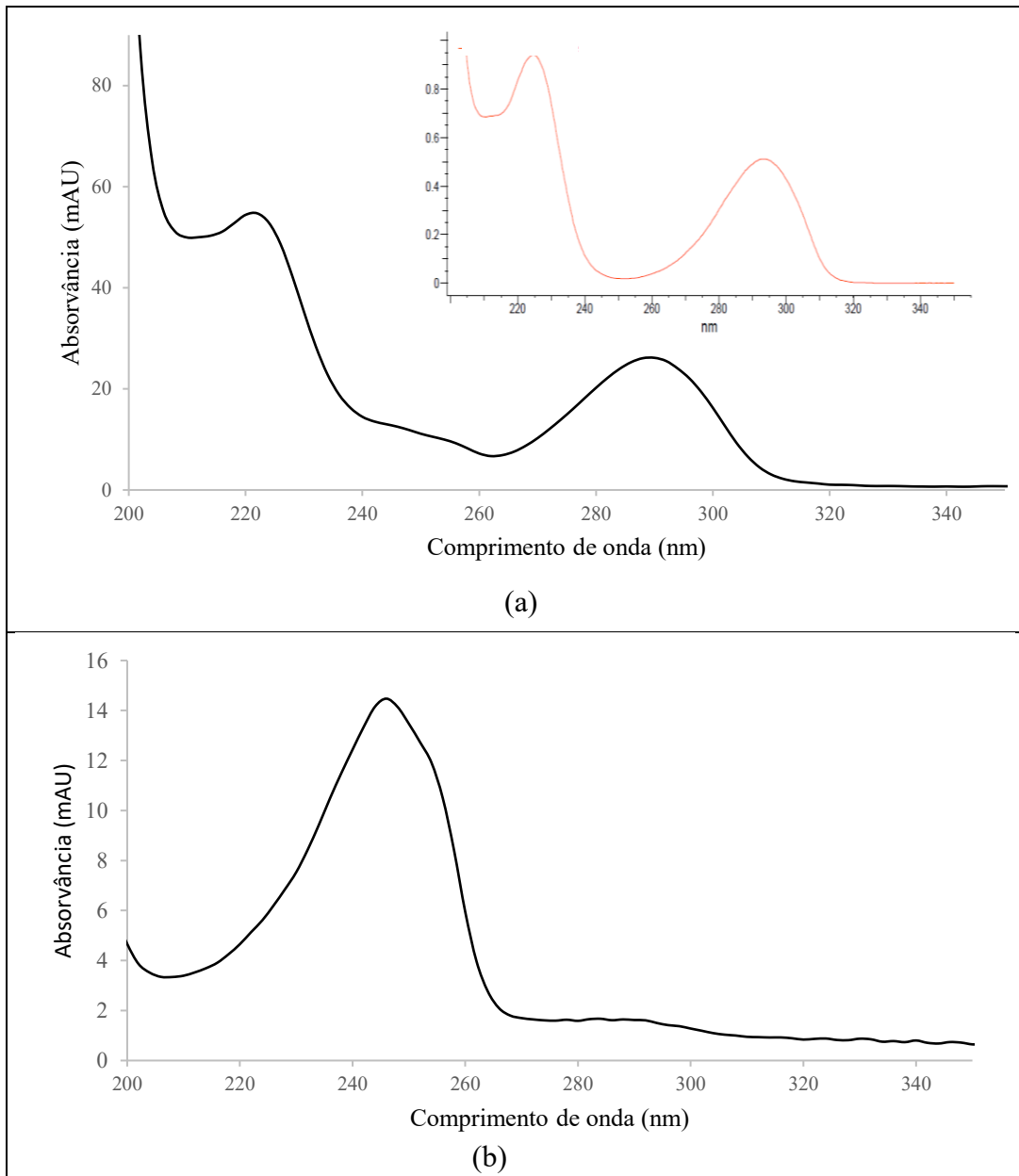


Condições experimentais: eletrólito composto por 20 mmolL^{-1} de tampão Tris/fosfato pH 7,5 e 40 mmolL^{-1} de SDS em 10 % de acetonitrila, capilar de 48,5 cm de comprimento total (40,0 cm de comprimento efetivo), $75 \mu\text{m}$ de diâmetro interno e $375 \mu\text{m}$ de diâmetro externo. Injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5 s, voltagem 20 kV, temperatura do cartucho $25 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em 287 nm e em 248 nm.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Primeiramente, foram observados sinais no mesmo tempo de migração em ambos comprimentos de onda selecionados. Resultado que também se mostrou inesperado, visto que a hidroquinona não deveria absorver na região de 248 nm. Diante de tal resultado, optou-se por aprofundar os estudos através da análise dos espectros de absorção UV referentes aos sinais citados (**Figura 16**).

Figura 16 - Espectros de absorção UV gerados dos experimentos por MEKC e obtidos em (a) 287 nm e (b) 248 nm e espectro teórico da hidroquinona (em vermelho).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

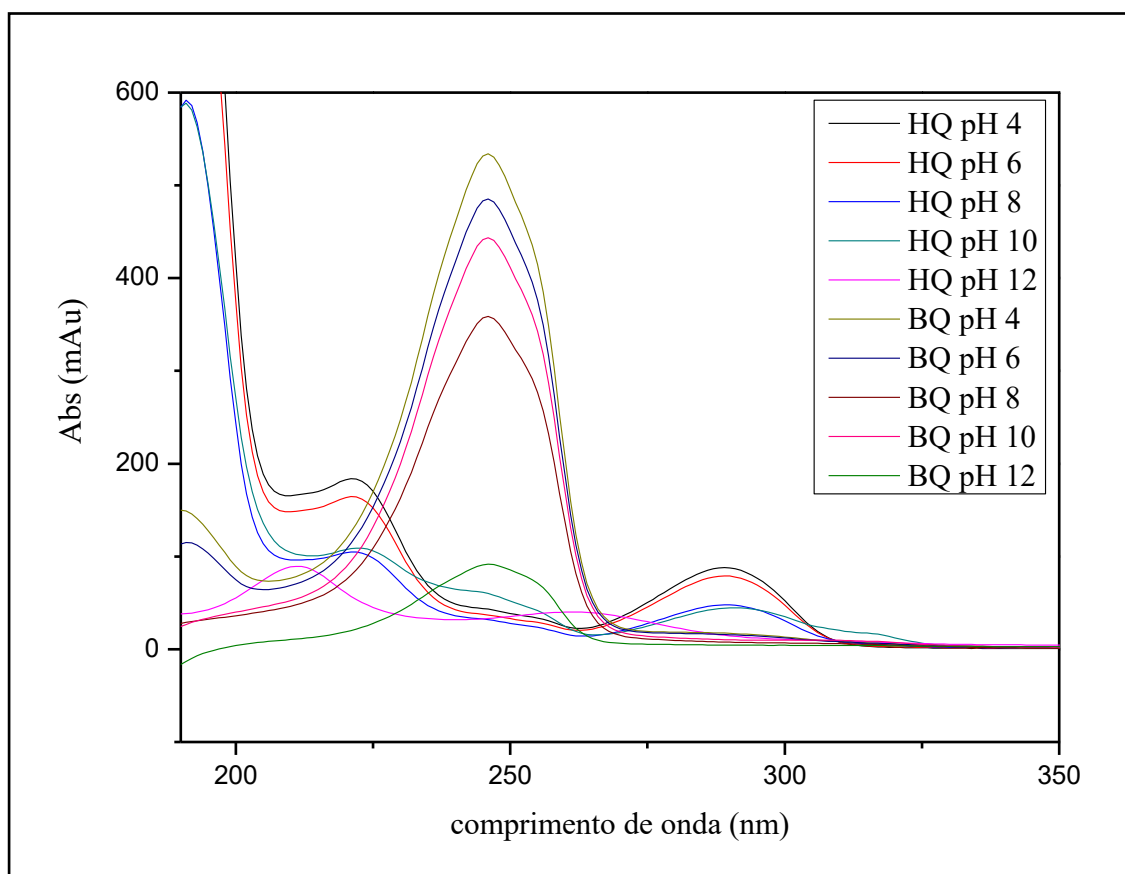
O espectro de absorção UV obtido do experimento com detecção em 248 nm, em (b), exibe um perfil característico da benzoquinona. Já o espectro obtido com detecção em 287 nm, em (a), exibe um perfil característico da hidroquinona. Contudo, quando comparado ao espectro teórico (em vermelho), nota-se que há uma leve contribuição inesperada de sinal na região entre 240 e 260 nm. Esse comportamento é tipo de misturas de compostos. O espectro teórico foi obtido conforme descrito no item 3.2.2.

Destaca-se novamente que tal experimento foi realizado apenas utilizando soluções padrão de hidroquinona recém preparadas. Portanto, os resultados do teste em questão sugerem que há a conversão de hidroquinona à sua forma oxidada, mesmo em meio não fortemente alcalino.

Perante tal resultado, os espectros de absorção UV gerados nas análises por CZE-UV em diferentes níveis de pH também foram estudados. O objetivo nesse momento foi avaliar se a reação de oxidação está ou não ocorrendo nas demais condições experimentais propostas. E ainda, foi feita a sobreposição dos espectros afim de estimar a proporção do desdobramento entre as espécies através da verificação de um possível ponto isobéstico.

O ponto isobéstico é o comprimento de onda em que as absorvâncias de todas as espécies convergem, desse modo, pode-se determinar quantas espécies estão presentes. Neste ponto as concentrações das duas formas seriam iguais. No entanto, não foi possível a observação de um ponto isobéstico no sistema (**Figura 17**).

Figura 17 - Sobreposição dos espectros de absorção UV da hidroquinona e benzoquinona obtidos no experimento por CZE-UV com ajuste de pH de 2 a 12.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Portanto, diante dos resultados de todos os experimentos discutidos nesta seção, algumas considerações importantes foram estabelecidas. Primeiramente, verifica-se a possibilidade da ocorrência da reação de oxidação em solução não apenas em meio alcalino, uma vez que os testes indicam uma mistura dos compostos nas condições estudadas.

Embora os resultados obtidos dos experimentos realizados com pH variando de 2 a 12 sugerem que ambas formas químicas coexistem em equilíbrio, independente do pH do meio, não foi possível mensurar a proporção de interconversão. Se confirmada essa possibilidade, uma análise quantitativa em meio líquido deve considerar a presença simultânea das duas espécies, qualquer que seja a técnica escolhida.

Em relação à essas técnicas analíticas, se concluído que a análise seja possível apenas em meio fortemente ácido, o desenvolvimento de uma metodologia por MEKC também é descartado, como comentado anteriormente, nessas condições a análise é dificultada devido à baixa magnitude do EOF, necessário para o carregamento das micelas.

Por fim, quando considerado os aspectos toxicológicos dos compostos, a possibilidade da presença da benzoquinona também em meio ácido torna-se preocupante, uma vez que estão associados à espécie os mecanismos de maior toxicidade. Perante tais proposições, novos estudos, envolvendo outras ferramentas analíticas, foram conduzidos com objetivo de esclarecer os questionamentos apontados.

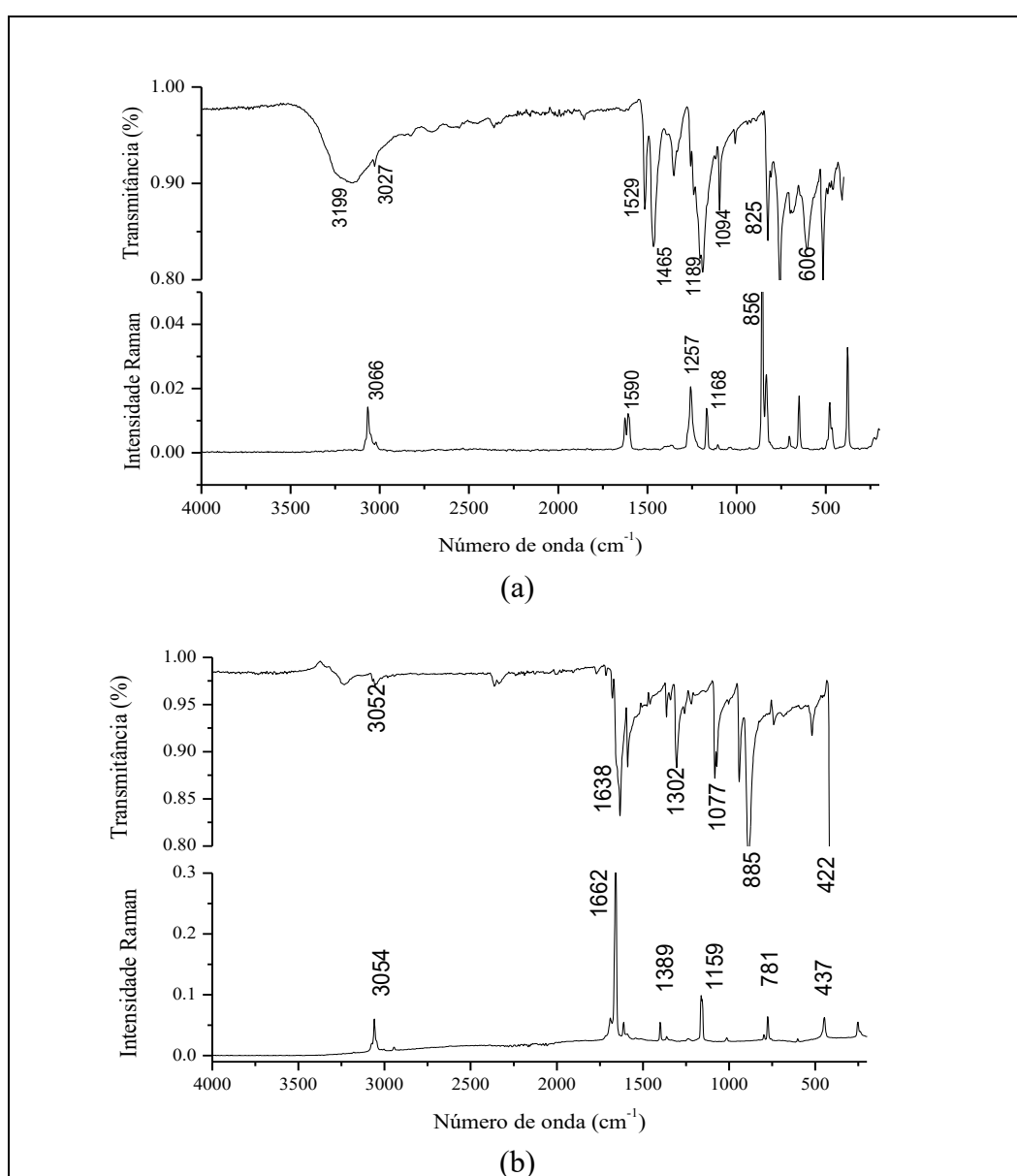
Uma das possibilidades consideradas, nesse ponto do trabalho, foi o comprometimento dos padrões ainda em fase sólida. Desse modo, a próxima etapa do trabalho envolveu a realização de ensaios de caracterização, a fim de descartar a possibilidade de os padrões utilizados não estarem de acordo com as especificações de pureza certificadas.

Até o momento, todos os experimentos foram realizados com uso de solventes. Uma vez que os resultados sugerem que em solução os compostos coexistem em um equilíbrio, para testificar a pureza de tais materiais, optou-se inicialmente pela realização de alguns ensaios de caracterização em fase sólida. Os compostos foram submetidos à análise por espectroscopia Raman, espectroscopia de absorção na região do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear.

4.2 MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS

Nessa etapa do trabalho, os padrões de hidroquinona e benzoquinona foram inicialmente submetidos à análise por espectrometria de absorção no infravermelho e por espalhamento Raman, conforme descrito nas seções 3.2.4 e 3.2.3, respectivamente (**Figura 18**). As atribuições das bandas registradas são descritas na **Tabela 6**.

Figura 18 - Espectros vibracionais de absorção no infravermelho e espalhamento Raman da (a) hidroquinona e (b) benzoquinona.



Condições experimentais IR: 54 scans com resolução de 4 cm^{-1} ; Raman: potência 10 mW, 512 scans com resolução de 4 cm^{-1}

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Tabela 6 - Atribuição das bandas dos espectros vibracionais de absorção no Infravermelho e espalhamento Raman.

Atribuições das bandas	Hidroquinona		Benzoquinona	
	IR	RAMAN	IR	RAMAN
v(O-H)	3199	-	-	-
v(C-H)	3027	3066	3052	3054
v(C=O)	-	-	1662	1683
v(C=C)	1529	1590	1302	1389
δ (O-H)	1465	-	-	-
v(C-O)	1189	1227	-	-
β (C-H)	1094	1168	-	-
γ (C-H)	825	856	885	781
τ (O-H)	606	-	-	-
β (C=O)	-	-	422	437

v = deformação axial; δ = deformação angular simétrica no plano; β = deformação angular assimétrica no plano; γ = deformação angular fora do plano; τ = deformação angular assimétrica no plano (torção)
 Fonte: Elaborado pela autora (2020).

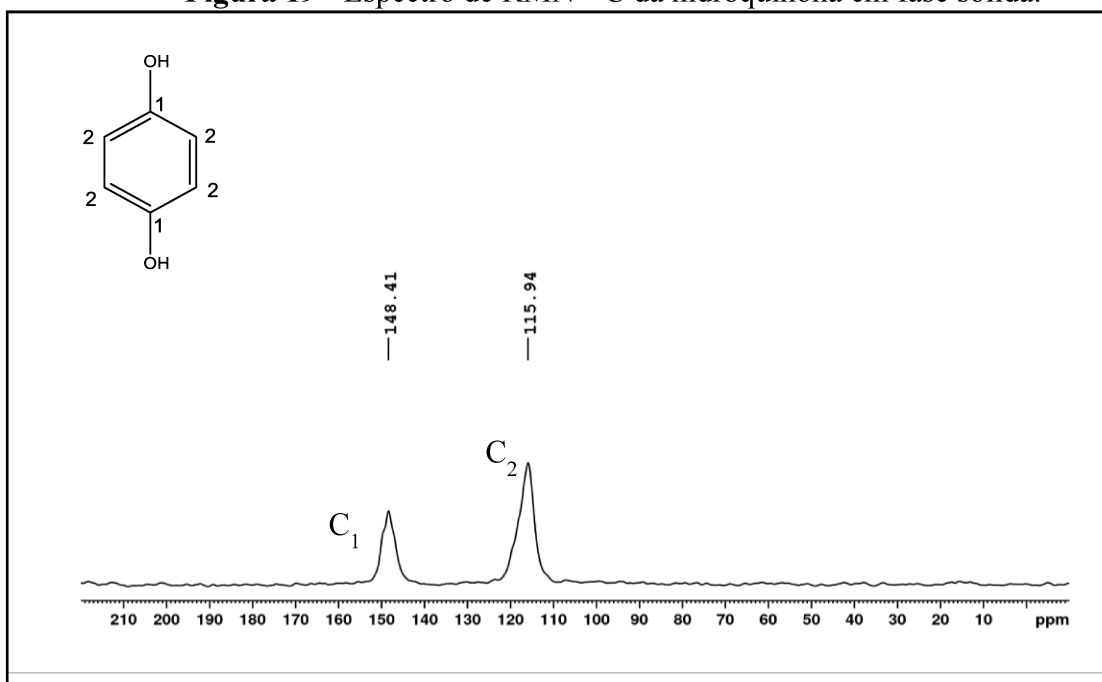
A principal diferença estrutural entre espécies em questão é a presença de hidroxilas na hidroquinona e carbonilas na benzoquinona. A espectroscopia é uma ferramenta excelente para determinar espécies com diferentes grupos funcionais. Quinonas em geral, possuem os grupamentos carbonila em um mesmo anel e absorvem entre 1690 e 1655 cm^{-1} , enquanto que bandas largas na região de 3200 cm^{-1} são características de compostos que contém hidroxila. (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Na tabela 7 são descritas as atribuições de algumas das bandas registradas nos espectros. Nota-se a presença exclusiva de bandas associadas às vibrações da carbonila no espectro da benzoquinona, bem como vibrações associadas à hidroxila aparecem exclusivamente nos espectros da hidroquinona.

Além disso, todas as atribuições estão de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Davies e Prichard (1963) e Kubinyi e Keresztury (1997), que descrevem detalhadamente a estrutura dos compostos em questão também utilizando as ferramentas espectroscópicas aqui citadas. Dessa forma, sugere-se que ambos se encontram em sua forma pura.

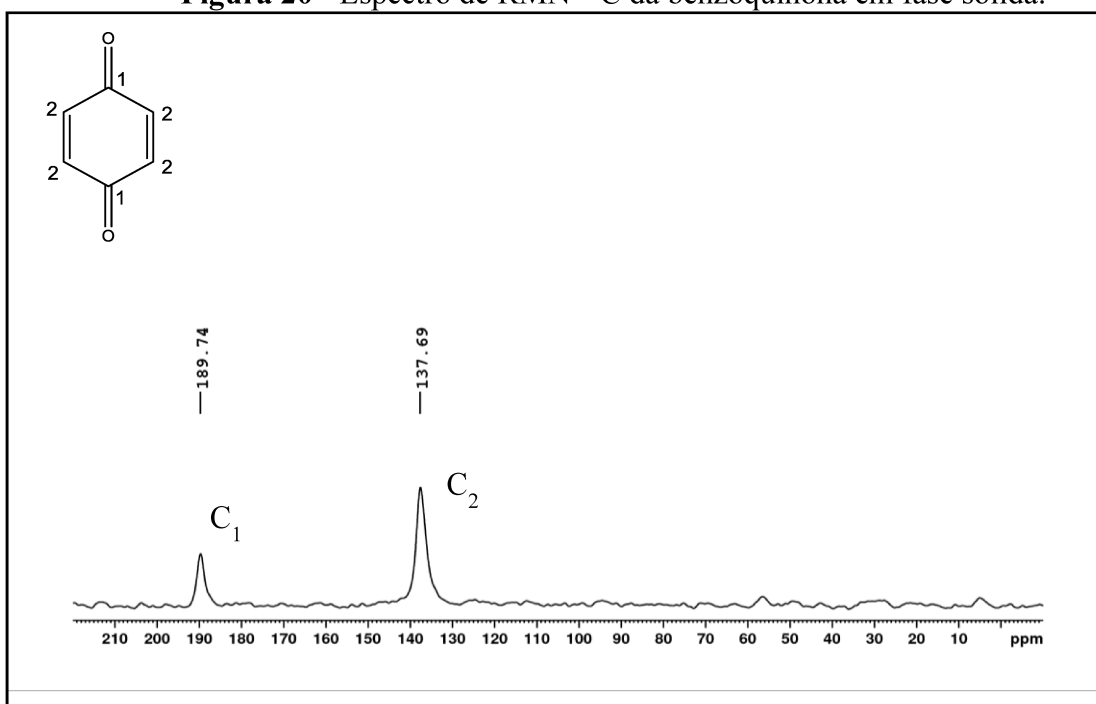
Para complementar o resultado, os padrões foram submetidos à análise por Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C em fase sólida, conforme descrito na seção 3.2.5 (**Figuras 19 e 20**).

Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C da hidroquinona em fase sólida.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C da benzoquinona em fase sólida.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Os espectros de RMN ^{13}C em fase sólida de ambos compostos (**Figuras 19 e 20**) também estão de acordo com o esperado, visto que não são observadas bandas que indiquem a presença de impurezas. Seja por contaminação dos próprios analitos ou quaisquer outras

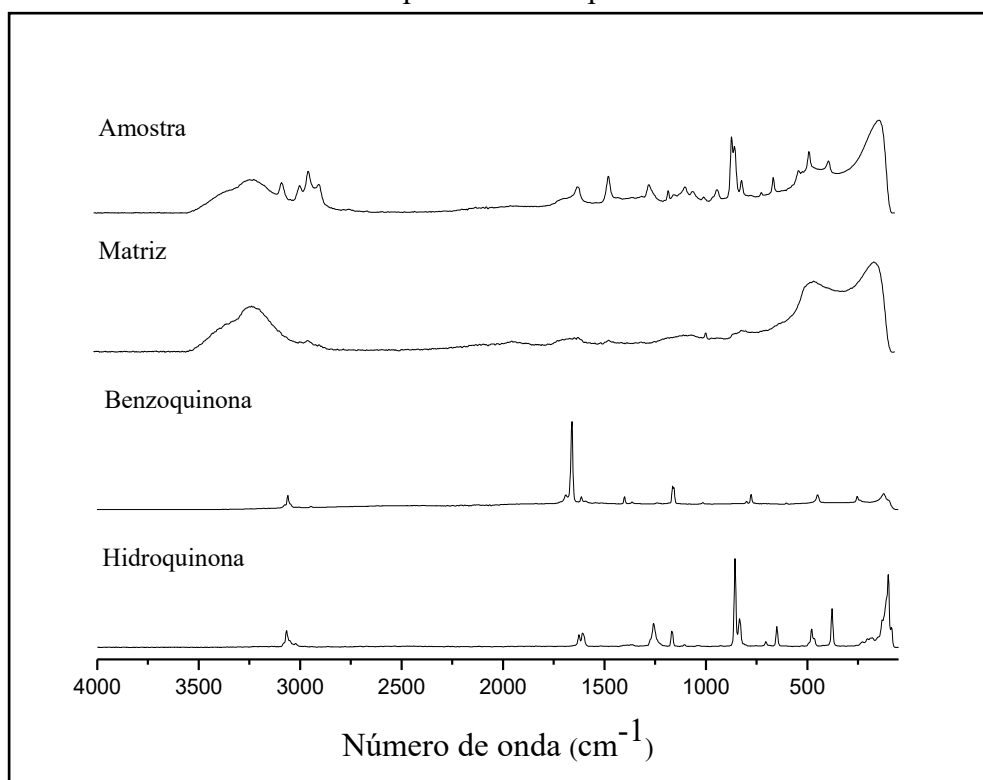
substâncias. Ou seja, os resultados obtidos por RMN ^{13}C corroboram com os resultados anteriores.

Isto posto, os resultados de caracterização descritos cumpriram o objetivo de investigar a pureza dos produtos adquiridos para este trabalho, e sugerem que ambos estão de acordo com a certificação, bem como, não sofreram alterações em suas propriedades durante o manuseio. Assim, certifica-se que os padrões podem ser usados para a continuidade do trabalho, sobretudo considerando sua utilização em uma abordagem quantitativa.

A espectroscopia Raman também foi utilizada para analisar amostras na forma de gel e a matriz replicada em laboratório (**Figura 21**). Destaca-se que as mesmas contêm grande parte de água na composição, assim, a intenção do experimento é investigar se a técnica permite elucidar questões sobre o equilíbrio entre as espécies no meio em que a amostra é mantida.

O procedimento experimental da análise por Raman é descrito na seção 3.2.3 e o preparo da matriz do gel dermatológico, na seção 3.2.10.

Figura 21 - Análise comparativa dos espectros Raman da amostra real, da matriz replicada em laboratório e dos padrões das espécies estudadas.



Condições experimentais: potência 10 mW para os sólidos e 100 mW para os géis, 512 *scans* com resolução de 4 cm^{-1} .

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

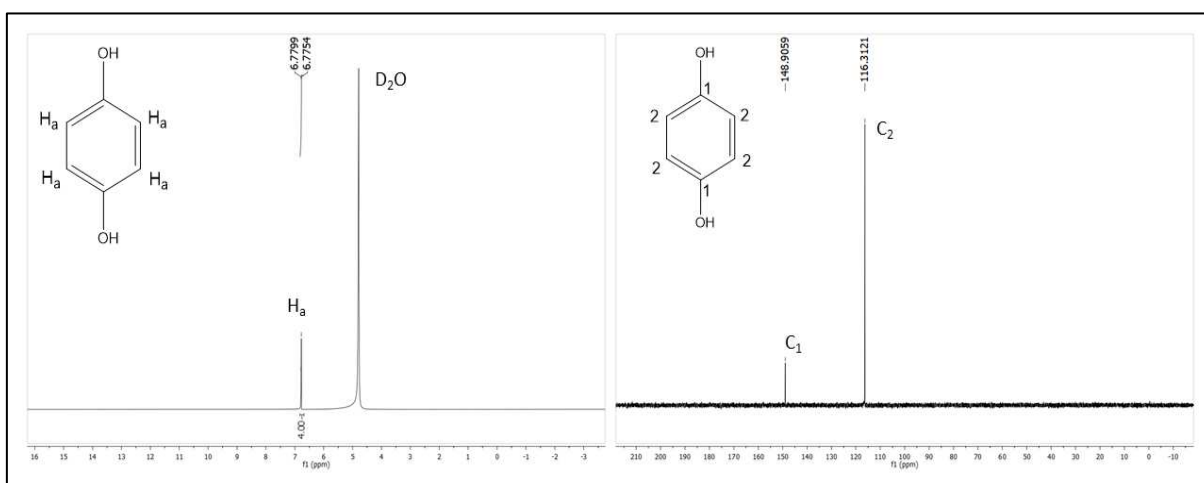
Observa-se o aparecimento de uma banda pronunciada na região de 856 cm^{-1} no espectro da amostra, banda que também está presente exclusivamente no espectro da hidroquinona. Esse resultado sugere que de fato contém hidroquinona na amostra, conforme o esperado. Com relação ao equilíbrio entre as espécies, é observado um sinal de pequena magnitude em 1620 cm^{-1} no espectro da amostra, que também é encontrado no espectro na benzoquinona, porém o sinal é comum aos espectros da hidroquinona e da matriz, ainda que em baixa intensidade.

Desse modo, não é possível fazer inferências sobre a presença de benzoquinona na amostra. Ainda que seja uma ferramenta interessante para análise dos produtos em meio hidratado e sem tratamento prévio, por não ter gerado resultados conclusivos em virtude da sobreposição de sinais, o uso da técnica para determinar a composição das soluções e amostras foi descartado.

Portanto, optou-se nesse momento pela obtenção de espectros de RMN ^1H e ^{13}C em solução, para verificar se nessas condições o RMN permite o esclarecimento dos indícios de conversão entre as substâncias, e possivelmente determinar a proporção do deslocamento do equilíbrio em questão.

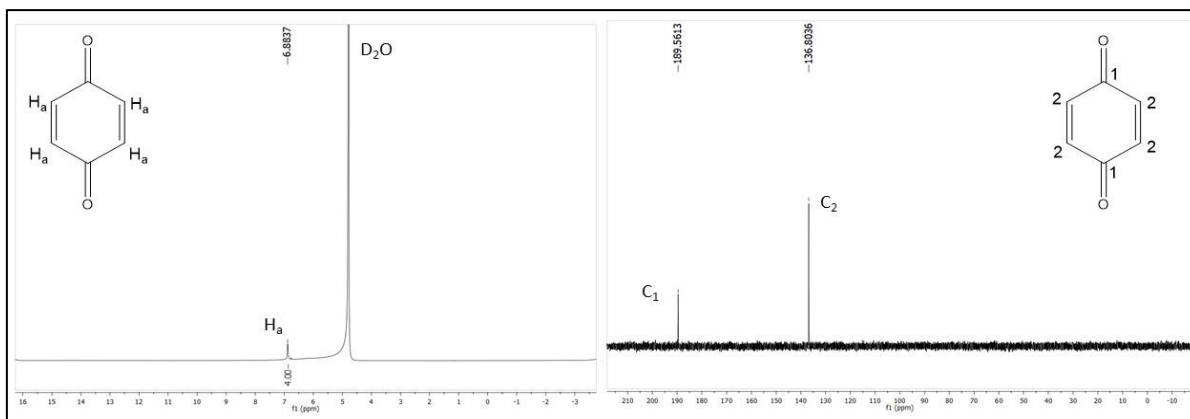
Os demais testes, discutido nas seções anteriores, foram preferencialmente realizados em meio aquoso, em virtude do uso de soluções tampão para ajuste de pH. Sendo assim, visando a análise comparativa de resultados, ambos foram individualmente solubilizados em D_2O e submetidos à análise de RMN de ^1H e ^{13}C , conforme descrito no item 3.2.5. (**Figuras 22 e 23**).

Figura 22 - Espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hidroquinona em D_2O .



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 23 - Espectro de RMN ^1H e ^{13}C da benzoquinona em D_2O .

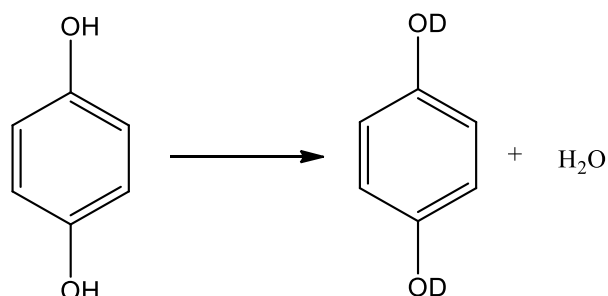


Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Por serem moléculas simétricas, é esperado no espectro de RMN ^1H , um sinal indicando a presença dos hidrogênios ligados ao carbono do anel benzênico, e outro sinal associado ao hidrogênio da hidroxila, no caso da hidroquinona. No espectro de ^{13}C de ambas espécies, espera-se um sinal referente ao carbono da posição cuja função química está acoplada, e outro sinal referente aos demais carbonos do anel.

Os espectros gerados pela análise da benzoquinona (**Figura 23**) apresentam todos os sinais esperados apenas para a substância, e nenhum indício de contaminantes. Por outro lado, é observado no espectro de ^1H da hidroquinona (**Figura 22**) apenas o sinal dos hidrogênios acoplados ao anel benzênico. Uma justificativa para esse resultado é a troca dos hidrogênios da hidroquinona pelos deutérios do solvente (**Figura 24**).

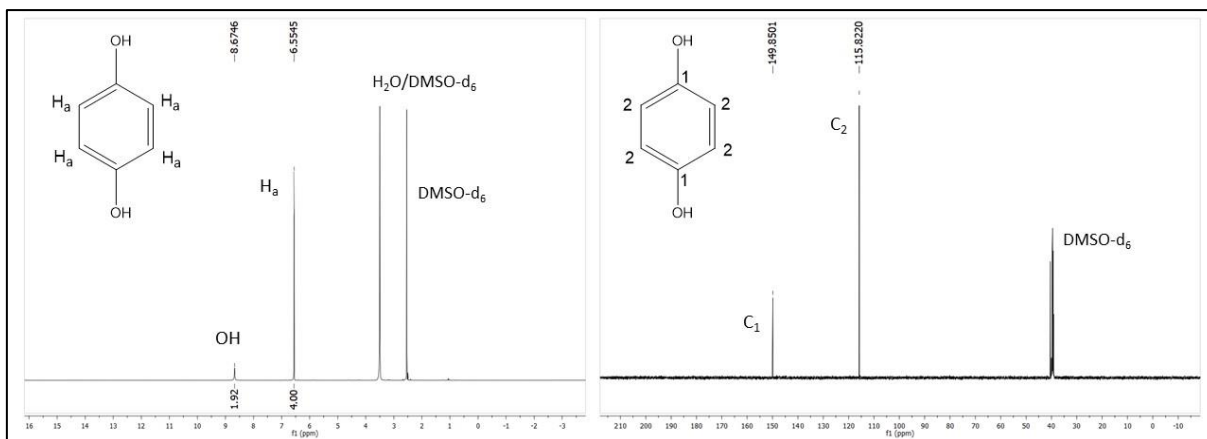
Figura 24 - Representação da reação de troca de hidrogênios da hidroxila da hidroquinona pelos deutérios do D_2O .



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

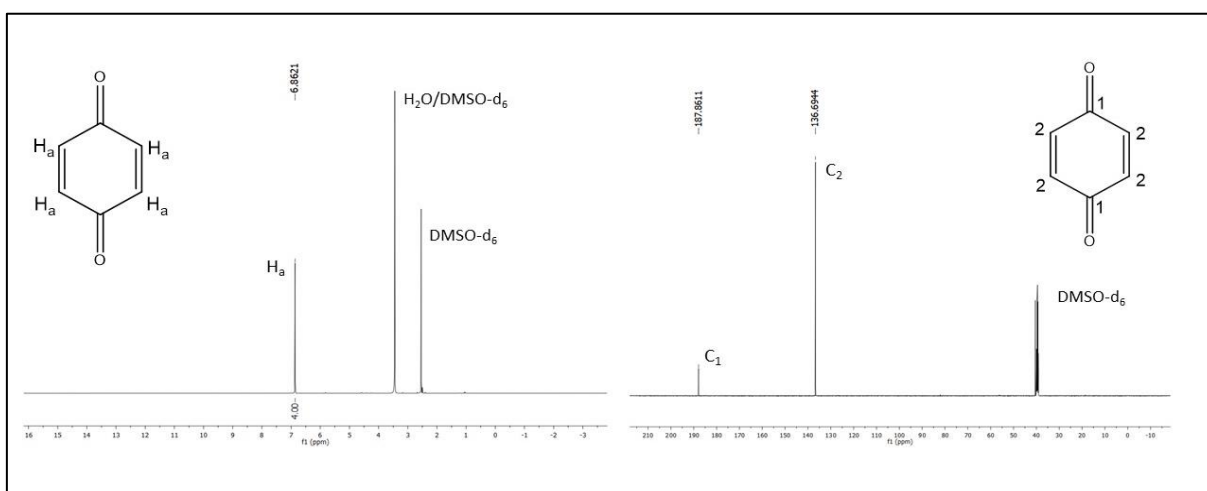
Devido a essa limitação, o mesmo experimento foi realizado pelo uso de DMSO-d_6 como solvente, conforme descrito na seção 3.2.5 (**Figuras 25 e 26**).

Figura 25 - Espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hidroquinona em DMSO-d_6 .



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H e ^{13}C da benzoquinona em DMSO-d_6 .



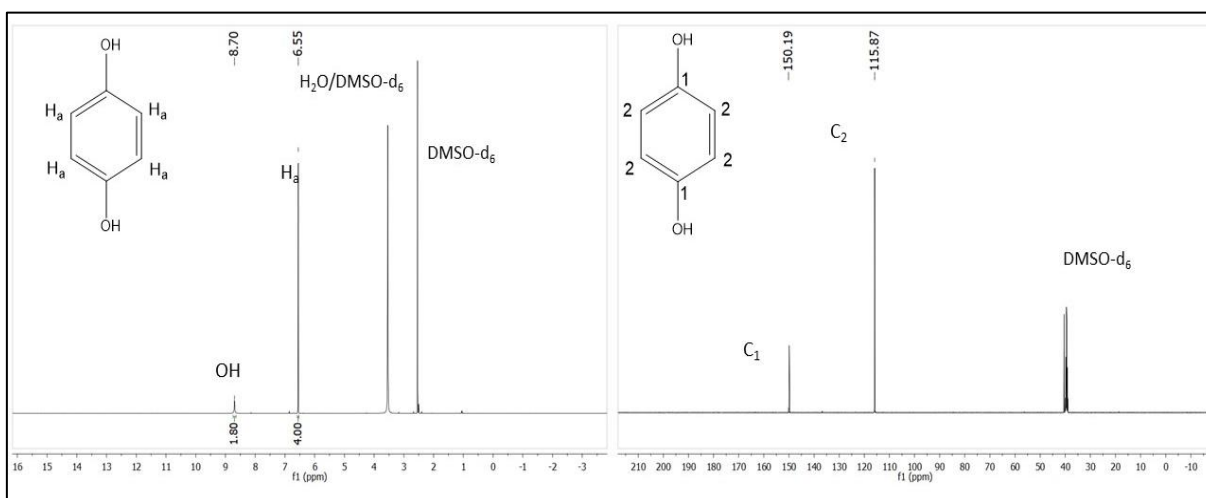
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

O uso de um solvente aprótico, como o DMSO, viabiliza a visualização do deslocamento químico referente ao hidrogênio da hidroxila no espectro da hidroquinona (**Figura 25**). Os espectros da benzoquinona (**Figura 26**) não exibiram modificações em relação ao experimento realizado em D_2O , discutido anteriormente. Porém, em nenhum dos ensaios foi possível a observação de sinais oriundos da reação de oxidação da hidroquinona, bem como a redução da benzoquinona.

Avaliando tais resultados isoladamente, poderia ser considerado que ambos estejam na sua forma original, sem ocorrência da reação de oxido-redução. Destaca-se que os espectros supracitados foram submetidos à análise imediatamente após o preparo das soluções, na intenção de evitar que exposição à luz e outros fatores viesse a comprometer as amostras.

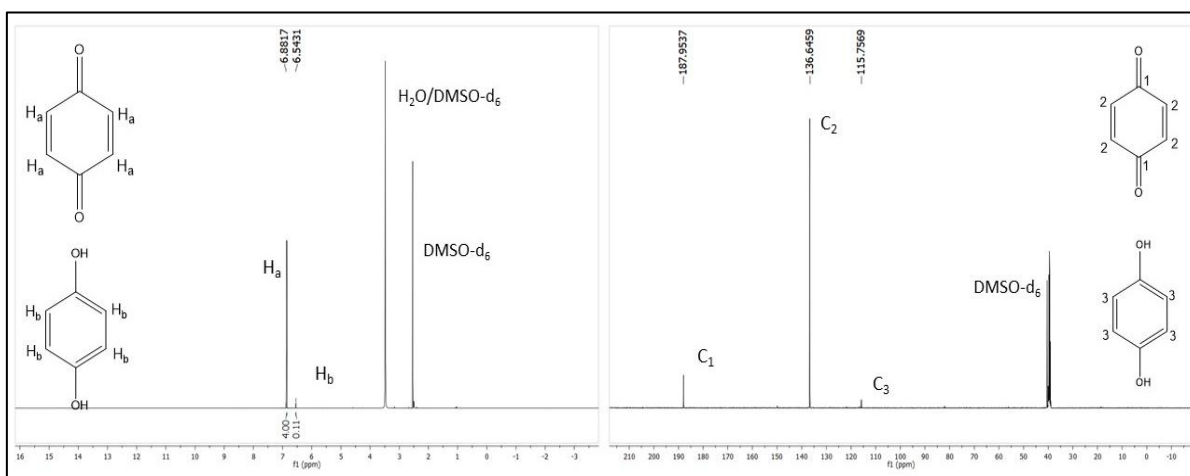
Posteriormente, ainda com o objetivo de observar a possibilidade de um equilíbrio, os mesmos tubos preparados anteriormente foram novamente submetidos à análise uma semana após o preparo (**Figuras 27 e 28**). Na ocasião já era possível observar a modificação de cor do tubo contendo a solução de hidroquinona, seja em D₂O ou em DMSO-d₆, indicando a oxidação do composto.

Figura 27 - Espectro de RMN ¹H e ¹³C da hidroquinona em DMSO-d₆ após uma semana do preparo.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 28 - Espectro de RMN ¹H e ¹³C da benzoquinona em DMSO-d₆ após uma semana do preparo.



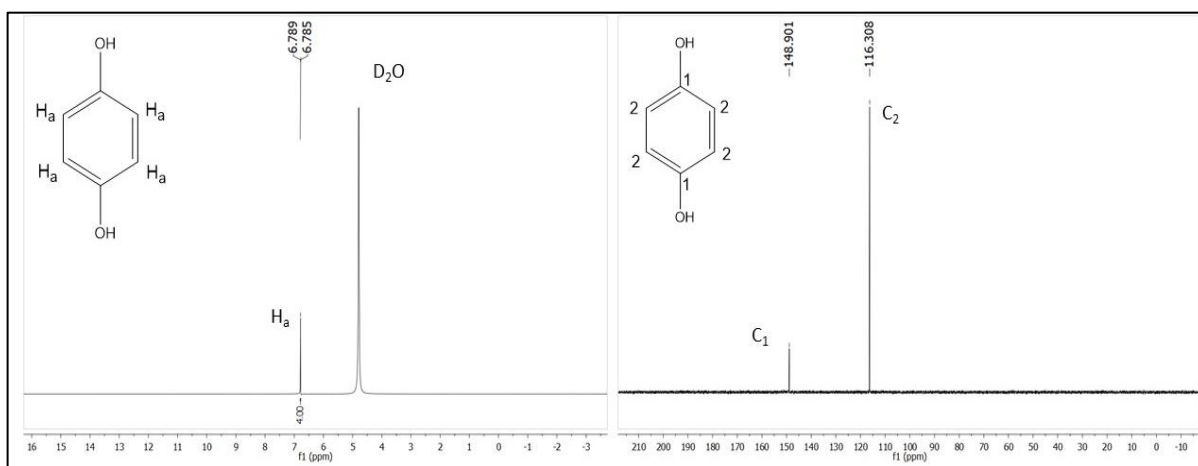
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

No caso da hidroquinona, apesar de observar indício de oxidação pela alteração na cor da solução, o espectro manteve-se o inalterado. Júnior e colaboradores (2007) realizaram um estudo semelhante direcionado à investigação de equilíbrios químicos por RMN. O autor também verificou o equilíbrio de uma dicetona pela obtenção de espectros de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 , escolhido para promover o equilíbrio. Entretanto, Júnior também relata que não foi possível a visualização de todos os sinais esperados para o monitoramento do equilíbrio no espectro de RMN ^1H .

Destaca-se que, seguindo o experimento referenciado, o estudo poderia ser realizado em CDCl_3 na tentativa de visualizar os sinais de desdobramento, no entanto a hidroquinona não é solúvel no solvente em questão. Júnior ainda comenta que uma das possibilidades de resposta para o problema é um equilíbrio rápido entre hidroxila, carbonila e hidroxila novamente, rápido o suficiente para não ser lido pelo RMN (JÚNIOR *et al.*, 2007). No entanto, no experimento realizado com a hidroquinona e a benzoquinona, não foi possível afirmar, até o momento, o motivo da ausência dos sinais que indicariam uma reação de oxidação.

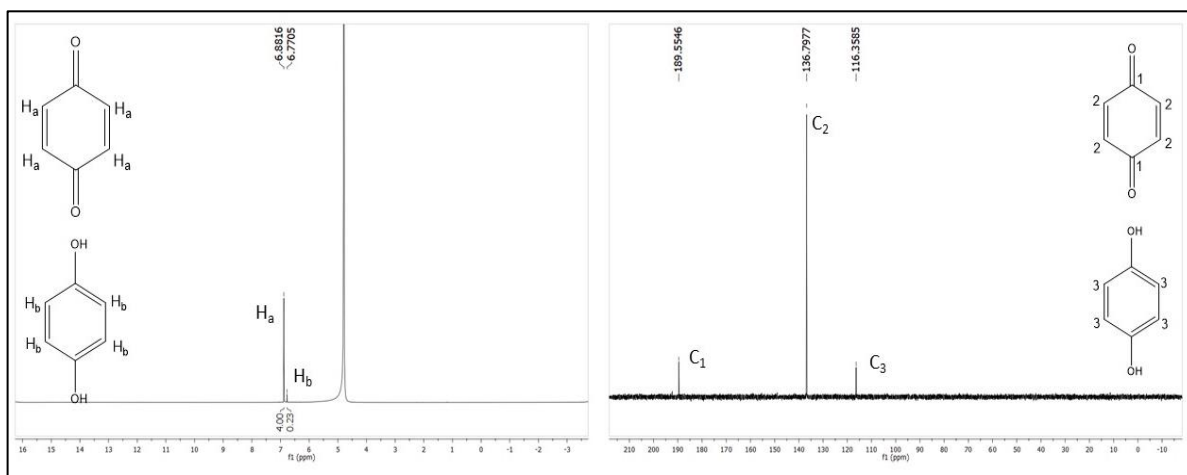
Em relação à benzoquinona, o espectro (**Figura 28**) exibe um pequeno sinal em 6,54 ppm no espectro de ^1H e em 115,75 ppm no espectro de ^{13}C . Esses sinais foram associados à presença da hidroquinona, pois nota-se que são semelhantes aos deslocamentos correspondentes à mesma (**Figura 27**). As mesmas observações são feitas nos espectros gerados em meio de D_2O (**Figuras 29 e 30**).

Figura 29 - Espectro de RMN ^1H e ^{13}C da hidroquinona em D_2O após uma semana do preparo.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Figura 30 - Espectro de RMN ^1H e ^{13}C da benzoquinona em D_2O após uma semana do preparo.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Após a realização de todos os testes espectroscópicos supracitados, confirmou-se que os padrões utilizados estão de acordo com as especificações. Porém, os estudos referentes à verificação da possibilidade de um equilíbrio químico entre as espécies quando em solução, apesar de sugerirem alguns indícios positivos, não foram conclusivos.

Dessa forma, a próxima etapa do trabalho envolveu a realização de novos testes na tentativa de estudar o comportamento da hidroquinona e da benzoquinona frente as modificações do meio. E assim, reunir informações necessárias para elaboração de uma proposta de quantificação.

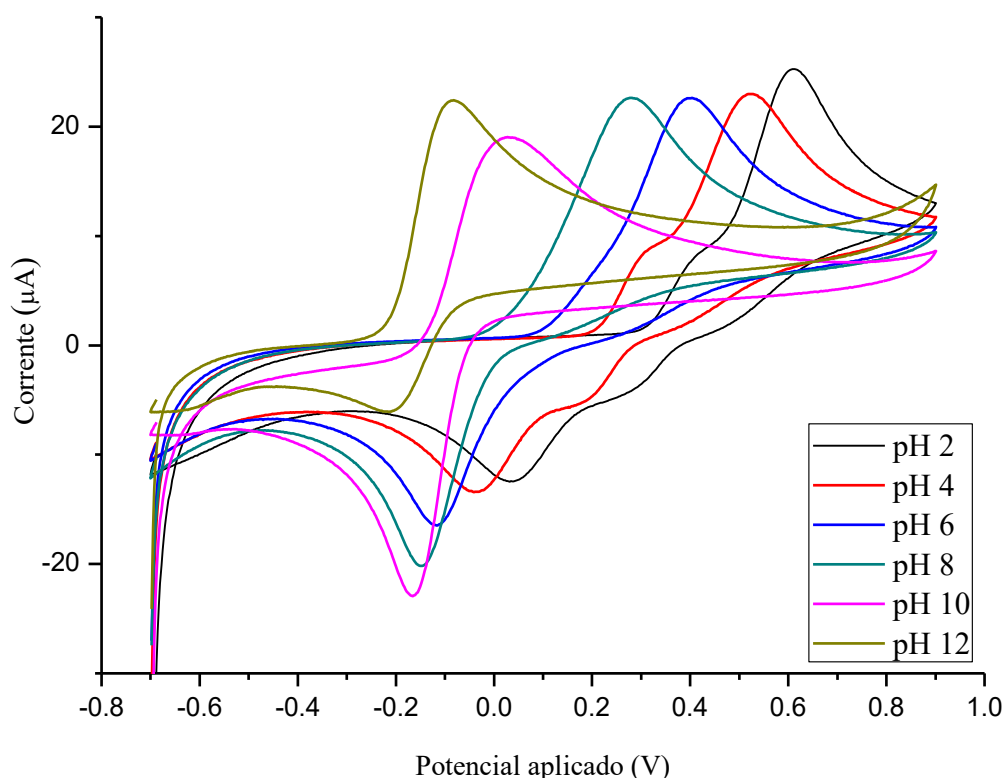
4.3 MÉTODOS ELETROANALÍTICOS

Nesta etapa do trabalho, foram exploradas algumas técnicas eletroanalíticas, que permitem o aprofundamento dos estudos exploratórios sobre a reação de oxidação e redução dos compostos em questão, bem como, o estudo de alguns parâmetros e condições experimentais importantes para as etapas quantitativas. Nesta seção serão discutidos os resultados referentes aos testes experimentais de modo a confirmar e/ou esclarecer as conclusões e questionamentos comentados nos tópicos anteriores.

4.3.1 Reversibilidade da reação

Inicialmente, testes por voltametria cíclica foram desenvolvidos a fim de investigar experimentalmente a reversibilidade da reação de oxidação da hidroquinona (**Figura 31**). As condições experimentais estão descritas no item (a) da Tabela 3 inserida da seção 3.2.6.1. O procedimento e demais descrições instrumentais também são descritas na seção 3.2.6.1.

Figura 31 - Voltamogramas cíclicos da hidroquinona em intervalo de pH de 2 a 12.



Condições experimentais: Eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Velocidade de varredura 100 mVs⁻¹.
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Define-se reversibilidade química, como a reação que pode ocorrer em ambas direções. Em eletroquímica, a reversibilidade é um conceito prático, e alguns parâmetros podem ser estabelecidos para classificar se uma reação é reversível, quase-reversível, ou irreversível. Dois destes, explorados neste presente trabalho e discutidos a seguir (SCHOLZ, 2002).

Uma reação é dita reversível quando apresenta um comportamento Nernstiano, ou seja, o potencial no eletrodo obedece à equação de Nernst (5) (SCHOLZ, 2002):

$$E = E^\circ - \frac{RT}{nF} \log \frac{C_{red}}{C_{oxi}} \quad (5)$$

Onde, E representa o potencial da célula, E° o potencial padrão, RT/F é uma constante cujo valor, a 298 K, é aproximadamente 0,0592 V e n é o número de elétrons envolvidos. Por último, C_{red} e C_{oxi} são as concentrações das espécies reduzidas e oxidadas, respectivamente.

Quando reversível, a reação ocorre em velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo (PACHECO *et al.*, 2013). A equação de Nernst expressa a relação entre a concentração na superfície do eletrodo e o potencial do mesmo. Dessa forma, é possível fazer inferências sobre a reversibilidade das reações em estudo (SCHOLZ, 2002). Em geral, o sinal de corrente, registrado no voltamograma, para uma reação reversível é dado pela equação de Randles-Sevcik (6):

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^3 A C D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

Onde i_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons, A a área do eletrodo (cm^2), C a concentração (mol.cm^{-3}), D o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) e v a velocidade do potencial de varredura (Vs^{-1}) (WANG, 2006).

De acordo com a equação (6), sabe-se que a corrente é diretamente proporcional à concentração das espécies (WANG, 2006). Assim, ao analisar o voltamograma cíclico registrado, esse parâmetro pode ser determinado qualitativamente pelo perfil do ciclo. Ou seja, uma vez que corrente e concentração são proporcionais, se os sinais das correntes catódica e anódica forem simétricos, este é um indicativo que a reação ocorre em ambas as direções, logo, reversíveis.

A posição dos picos no eixo de potencial também é um parâmetro relacionado com a reversibilidade de reação. Para uma reação reversível a distância entre os picos deve obedecer à equação (7):

$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,0592}{n} \quad (7)$$

De acordo com a equação, a distância no eixo de potencial entre o pico anódico (E_{pa}) e o pico catódico (E_{pc}) deve ser igual à razão de 0,0592 sobre o número de elétrons envolvidos nessa reação. Qualitativamente, quando os picos estiverem demasiadamente distantes, sabe-se que essa condição não será atendida. Para processos irreversíveis, ou seja, aqueles com lenta transferência de elétrons, os picos individuais são reduzidos em tamanho (assimétricos) e amplamente separados (WANG, 2006).

Seguindo as condições de reversibilidade supracitadas, o voltamograma registrado em pH 10, pKa da hidroquinona, apresenta um perfil simétrico com potenciais de pico próximos. Logo, atende os dois requisitos de reversibilidade discutidos.

Em contrapartida, em meio ácido nota-se que apesar dos voltamogramas exibirem sinais simétricos, os potenciais de pico são distantes. Nesse caso, a diferença entre os potenciais de pico é maior do que o estabelecido, portanto, não atende a um dos requisitos de reversibilidade. Já em pH 12, apesar dos potenciais de pico estarem próximos, em virtude do perfil assimétrico do voltamograma também foi descartada a reversibilidade. Reações com esse comportamento são chamadas de quase-reversíveis.

A reversibilidade da reação é um fator de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho. Quando considerado que o objetivo envolve uma abordagem quantitativa das espécies em questão, é preciso garantir que não haja alterações na composição do conteúdo inicial da amostra durante a realização dos testes.

Ao fazer um paralelo com eletroforese capilar, que também faz uso de aplicação de campo elétrico, ainda em maior escala do que a voltametria, os resultados das medidas eletroanalíticas discutidos sugerem que pode estar havendo conversão entre as espécies a partir da aplicação desse potencial, seja de hidroquinona à benzoquinona ou no sentido inverso.

É importante destacar ainda que embora há indícios de quase-reversibilidade de reação, no momento da obtenção dos resultados foi observado que apenas alterando a característica da solução, seja de meio ácido para básico ou de meio básico para ácido, sua coloração também altera. Portanto, conclui-se que a modificação do meio reacional de fato altera o equilíbrio entre as espécies.

Nesse ponto, é estabelecida uma importante conclusão, visto que variações no pH alteram o equilíbrio entre as espécies, se considerarmos a possibilidade da coexistência de ambas na amostra, o pH da mesma não deve ser alterado para se adequar a uma metodologia.

Independente da técnica escolhida, as amostras devem ser preparadas em soluções tamponadas com o pH ajustado ao mesmo em que se encontra a amostra, caso contrário, os resultados de quantificação obtidos podem não ser fiéis ao que há no produto comercializado.

4.3.2 Determinação dos coeficientes de difusão

Uma característica importante dos experimentos por técnicas eletroanalíticas é o tipo de transporte de massa envolvido em cada uma destas. Na voltametria cíclica e na

cronoamperometria, métodos aqui explorados, está presente o transporte de massa por difusão. Portanto, o coeficiente de difusão das espécies em estudo não podem ser ignorados (BAUR, 2007).

A difusão é o movimento espontâneo das espécies sob a influência do gradiente de concentração. As espécies movem-se da região de maior a menor concentração, na intenção de minimizar essa diferença (WANG, 2006). Devido a isso, sistemas que envolvem transporte de massa por difusão, requerem a determinação do coeficiente de difusão dos analitos. O coeficiente de difusão (D) é um valor intrínseco que sofre influência de fatores como temperatura, viscosidade, eletrólito e outros (BAUR, 2007).

Em relação aos analitos deste presente trabalho, não foram encontrados na literatura seus respectivos valores de coeficiente de difusão determinados nas mesmas condições experimentais aqui utilizadas. Portanto, um novo procedimento foi realizado afim de determinar os coeficientes de difusão da hidroquinona e benzoquinona.

Para isso, foi determinado inicialmente o valor de área da superfície do eletrodo de trabalho de carbono vítreo, usado em todos os experimentos eletroanalíticos deste trabalho, a partir de uma solução de coeficiente de difusão conhecida. Nesse experimento, uma solução de ferricianeto de potássio foi submetida à análise por voltametria cíclica em velocidades de varredura distintas, conforme descrito na seção 3.2.6.2.

Os dados resultantes dos voltamogramas permitem a construção da curva i_p (μA) versus $v^{1/2}$ (Vs^{-1}), cujo coeficiente angular pode ser utilizado com os demais parâmetros conhecidos para o Ferro (III) na equação de Randles-Sevcik. Ao rearranjar a equação em termos da área do eletrodo, temos (WANG, 2006):

$$A = \frac{i_p}{v^{1/2}} \times \frac{1}{(2,686 \cdot 10^{-5}) n^{\frac{3}{2}} D^{\frac{1}{2}} C}$$

Ao aplicar os valores conhecidos na equação, a área do eletrodo encontrada foi igual a $0,060 \text{ cm}^2$. De posse desse valor, foi usado novamente a equação de Randles-Sevcik para determinação do coeficiente de difusão da hidroquinona e da benzoquinona, cujo valores de coeficiente angular da curva i_p (μA) versus $v^{1/2}$ (Vs^{-1}) também foram calculados a partir nos ensaios descritos na seção 3.2.6.2.

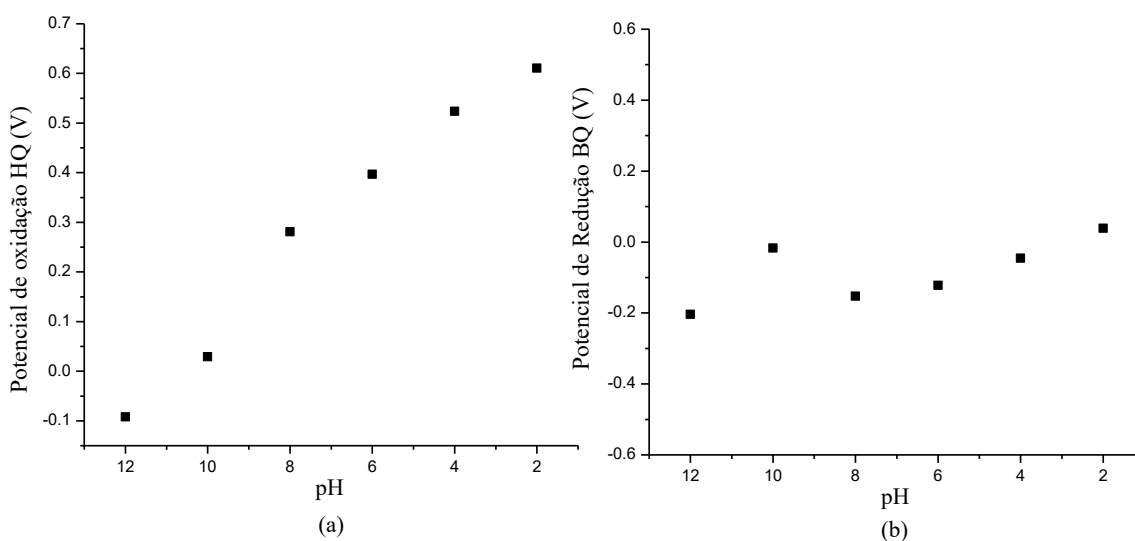
Após os cálculos acima, os valores de coeficiente de difusão (D) obtidos foram de $6,95 \times 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para a hidroquinona e $1,54 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ para a benzoquinona.

De acordo com os valores obtidos, temos que a benzoquinona se difunde cerca de 45% mais do que a hidroquinona. O fato tem implicações na intensidade dos sinais verificados por voltametria cíclica por exemplo, porém nesse caso não interferem na interpretação dos mesmos.

4.3.3 Relação entre Potenciais de pico e pH

Outra informação extraída dos dados resultantes do estudo por voltametria cíclica em discussão, é a relação entre pH e a facilidade de oxidação da hidroquinona ou redução da benzoquinona. Ao correlacionar os potenciais de pico anódico, ou seja, os potenciais de oxidação da hidroquinona, e analogamente, os potenciais de redução da benzoquinona em cada pH, nota-se a influência do meio na reação (**Figura 32**).

Figura 32 - Relação entre pH e potenciais de pico de oxidação da hidroquinona (a) e redução da benzoquinona (b).



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Observa-se em (a) que à medida que o meio se torna mais alcalino, menor é o potencial requerido para que a reação de oxidação da hidroquinona aconteça, portanto, mais fácil. Em geral, esperava-se que em meio alcalino a oxidação fosse facilitada, tendo em vista que é favorável para a prevalência da benzoquinona.

Em contrapartida, no caso da reação de redução da benzoquinona em (b), a curva de potencial vs pH não exhibe um comportamento linear quando comparada à hidroquinona. De modo geral, sugere-se que a reação inversa sofre menor influência do meio reacional.

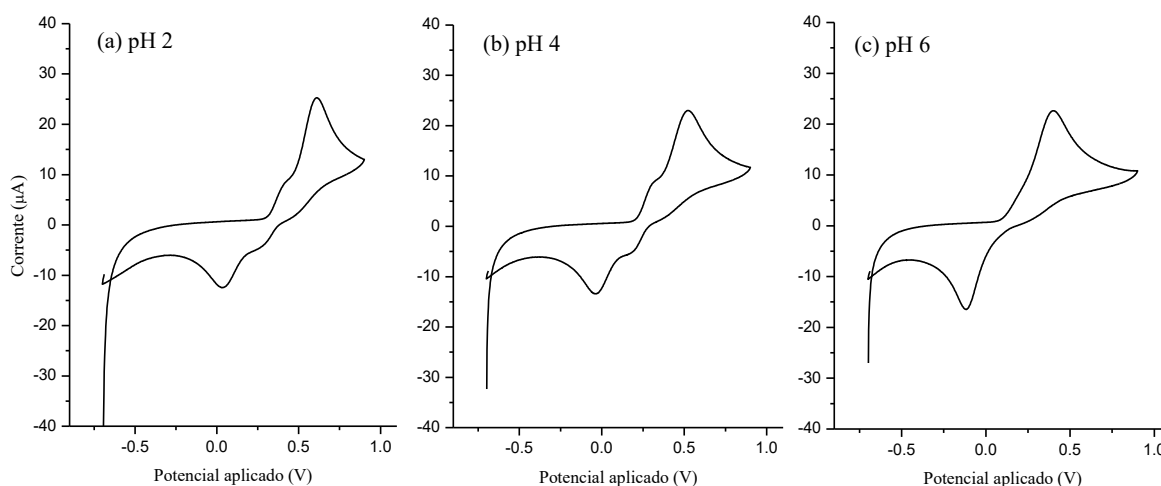
Em estudo semelhante realizado por Bian e colaboradores (2019), que também avaliou a relação entre pH e as reações em questão, utilizando voltametria de pulso diferencial, o autor descreve o mesmo resultado. Pelo teste feito pelo grupo, é observado do mesmo modo a maior influência do pH do meio na reação de oxidação da hidroquinona, em comparação com a reação inversa.

4.3.4. Mecanismo de reação

Em relação ao mecanismo de reação, diversos estudos investigam as reações de oxidação e redução de quinonas, e é bem estabelecido que a oxidação completa da hidroquinona a benzoquinona em meio aquoso envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons. E assim como os resultados dos experimentos realizados neste trabalho indicaram, ou autores também relatam sobre a influência do pH no mecanismo de reação (NAGARAJA & VENKATESHA, 2018, MONKS *et al.*, 1992; SHIM & PARK, 1997).

Os voltamogramas cíclicos em discussão, obtidos em valores de pH 2, 4 e 6, exibem perfis característicos da presença intermediários de reação (**Figura 33**).

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos da hidroquinona em (a) pH 2, (b) pH 4 e (c) pH 6.

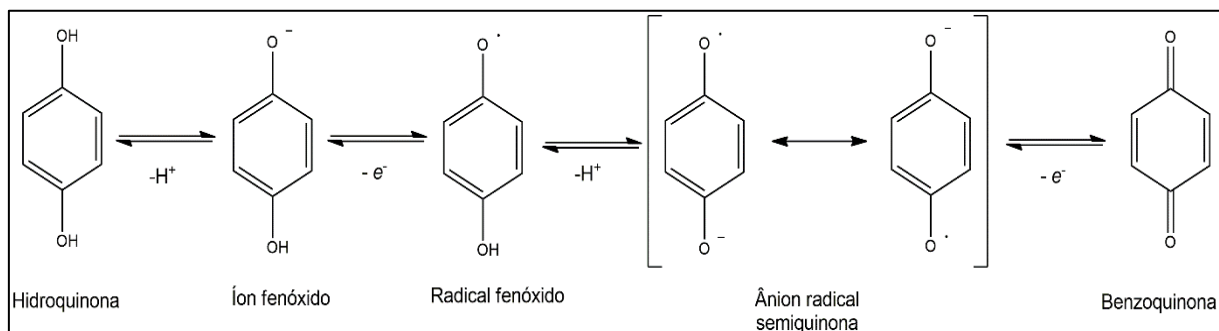


Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Estudos similares realizados por Shim e Park (1996), Nagaraja e Venkatesha (2018), Hayashi e colaboradores (2011) e Taran (2017), entre outros, também investigam o mecanismo

da reação em estudo. Os autores sugerem que reação pode ocorrer em mais de uma etapa, formando um intermediário conhecido como semiquinona (**Figura 34**).

Figura 34 - Esquema representativo do mecanismo de oxidação e redução de quinonas.



Fonte: Vollhardt & Schore (2009).

Outras propostas de mecanismo são descritas na literatura, alguns autores consideram a possibilidade da formação de associações entre a hidroquinona e a benzoquinona como parte do processo de oxidação (NAGARAJA & VENKATESHA, 2018). Shim, por sua vez, propõe e estuda a formação de dímeros. Por fim, demais autores sugerem a formação de complexos chamados de quinindronas (GAMBOA-VALERO *et al.*, 2016; TOSSEL, 2009).

Diante dos resultados, e considerando que a reação global envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, acredita-se que em meio ácido as reações ocorram em etapas, conforme representado na figura 36, visto que nessas condições a liberação de prótons, etapa presente no mecanismo, é dificultada.

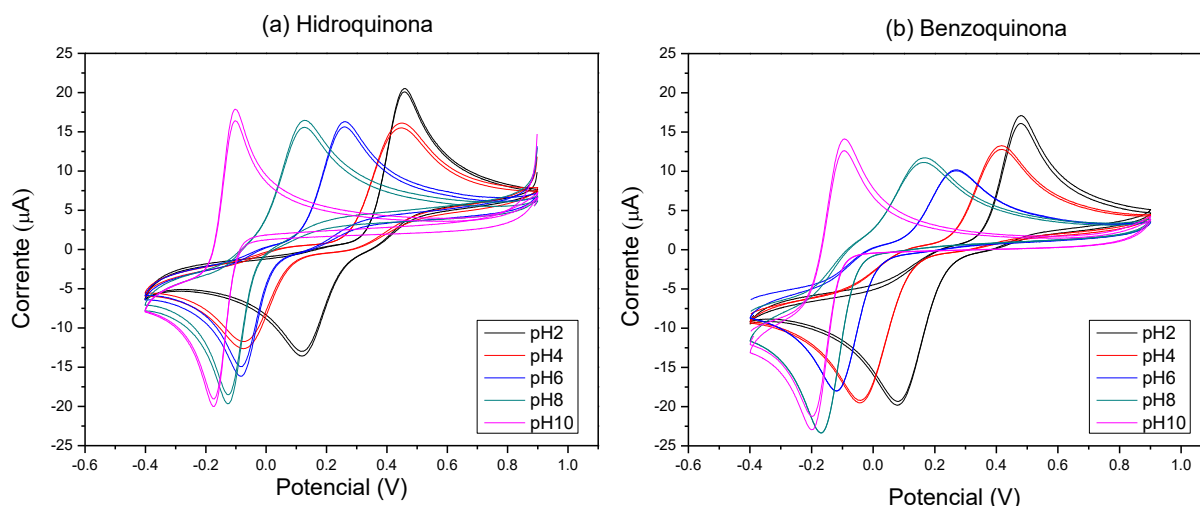
Sobre o intermediário de reação, a semiquinona, sabe-se que caso presente em meio fisiológico a espécie é associada ao carácter toxicológico dos analitos, uma vez que radicais são propícios para formação das chamadas ERO, que podem causar danos celulares, conforme abordado na seção 1.3.

4.3.5 Determinação do conteúdo inicial das soluções padrão

Em continuidade aos estudos exploratórios relacionados ao equilíbrio entre as espécies, foram elaborados novos estudos com o objetivo de verificar a conversão das espécies quando solubilizadas em água. Para isso, novos experimentos mediados por voltametria cíclica foram realizados conforme procedimento descrito no item 3.2.6.1. As condições experimentais estão

listadas nos itens (b) e (c) da tabela 3 na mesma seção. Os resultados são explicitados na **Figura 35**.

Figura 35 - Voltamogramas cíclicos da hidroquinona (a) e benzoquinona (b) em intervalo de pH de 2 a 10.



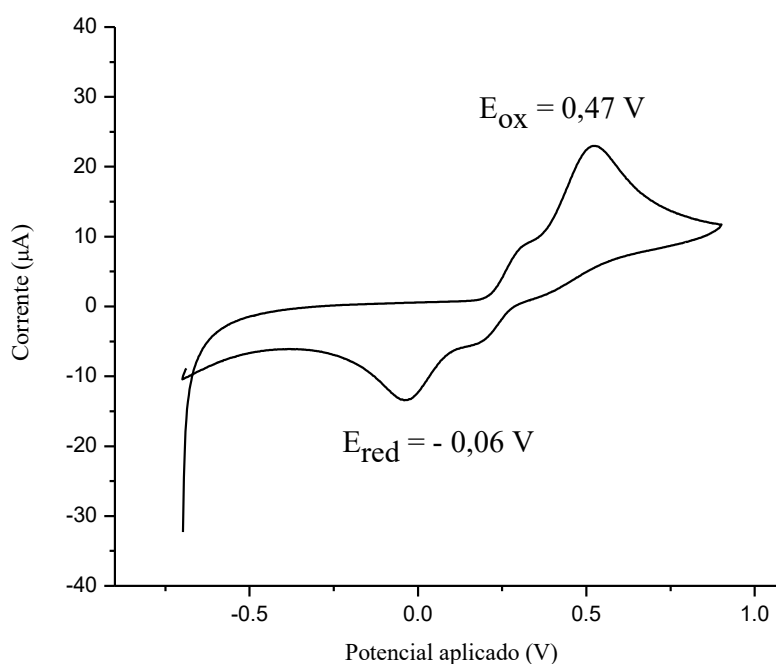
Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Velocidade de varredura 100 mVs⁻¹

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Este experimento foi elaborado de modo a gerar dados que determinassem o conteúdo inicial da solução preparada de cada um dos padrões em estudo. Uma vez que a hidroquinona é a espécie reduzida do equilíbrio, o potencial foi aplicado à essa solução de forma a induzir a redução das espécies presentes no meio. Analogamente, sabendo que a benzoquinona é a espécie oxidada do equilíbrio, o potencial foi aplicado à solução de forma a induzir a oxidação da mesma.

Pela análise dos voltamogramas da figura 37, em (a) poderia ser considerado que a geração de uma corrente catódica indica que a benzoquinona, espécie na forma oxidada, já está presente em solução e sofreu uma redução. Em (b) os sinais correspondentes às correntes anódicas geradas, poderia ser um indicativo da presença de hidroquinona em solução e sofreu oxidação. Assim, poderia ser concluído que ambas espécies estão presentes na solução preparada a partir dos padrões individuais na forma sólida.

No entanto, uma vez determinado os potenciais de oxidação e redução da hidroquinona considerando o ciclo completo, esta seria uma interpretação equivocada dos dados. Ao isolar o voltamograma cíclico obtido no pH 4, por exemplo (**Figura 36**), o potencial aplicado inicialmente (0,9 V) no sentido de varredura que fornece o sinal de redução, foi maior do que o potencial estabelecido para a oxidação, cerca de 0,4 V.

Figura 36 - Voltamograma cíclico da hidroquinona em pH 4

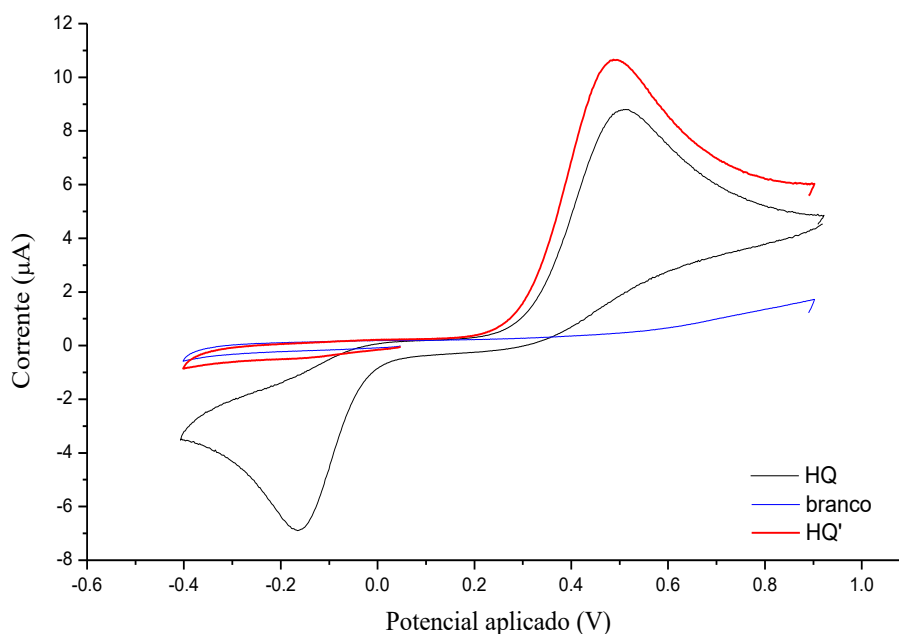
Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Velocidade de varredura 100 mVs⁻¹.
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Nesse contexto, a corrente catódica gerada corresponde à redução do produto formado da oxidação da hidroquinona, originalmente em solução, proporcionada pela aplicação da voltagem citada. Ou seja, a benzoquinona reduzida foi gerada em decorrência do intervalo de potencial aplicado durante o experimento.

De modo a confirmar essa conclusão, experimento semelhante foi realizado, porém com um novo intervalo para aplicação do potencial. Para acompanhar exclusivamente a reação de redução da espécie originalmente em solução, um ciclo parcial foi programado pra iniciar em potencial abaixo de 0,4 V, a fim de garantir que não haja formação de outra espécie. O procedimento é descrito na seção 3.2.6.1 e as condições experimentais listadas nos itens (d) e (e) da Tabela 3 na mesma seção. Os resultados são mostrados na **Figura 37**.

Nesta etapa, optou-se por avaliar o comportamento da hidroquinona no pH em que a amostra é mantida. De acordo com a norma técnica descrita pelo Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2012b), qualquer formulação comercializada na forma de gel aquoso de alta viscosidade deve ser preparada com pH mantido entre 5,0 e 6,0. Assim, optou-se por ajustar o pH dos experimentos usando a média entre os limites, 5,5.

Figura 37 - Voltamograma cíclico parcial da hidroquinona em pH 5,5.



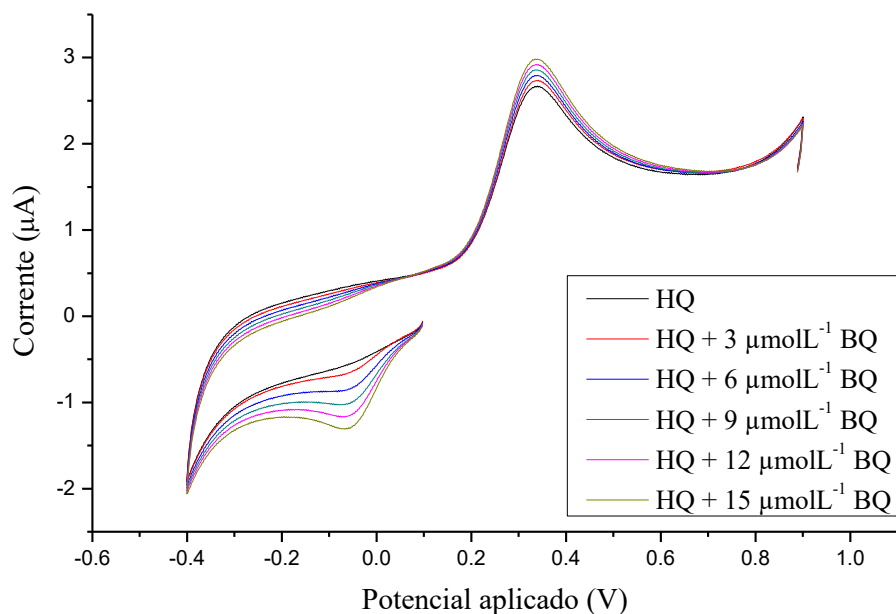
Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Velocidade de varredura 100 mVs⁻¹.

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A partir da comparação dos sinais citados, observa-se que não há geração de corrente catódica no ciclo parcial, como acontece quando feito o ciclo completo. Logo, não há em solução uma espécie a ser reduzida. Esse experimento sugere que neste pH não ocorre a oxidação da hidroquinona após solubilização, ou, a conversão ocorre em um percentual abaixo do limite de detecção do teste.

A fim de garantir a confiabilidade do resultado descrito, a partir do voltamograma cíclico parcial da hidroquinona a 66 µmolL⁻¹, foram feitas adições de alíquotas de benzoquinona na intenção de avaliar se o sinal de redução seria gerado nessas condições. O procedimento é descrito na seção 3.2.6.1 e as condições experimentais específicas estão listadas no item (f) da Tabela 3 na mesma seção. Os dados resultantes são mostrados na **Figura 38**.

Figura 38 - Voltamogramas cíclicos da hidroquinona com adição de alíquotas sucessivas de benzoquinona.



Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ e eletrodo auxiliar de platina. Velocidade de varredura 100 mVs^{-1}

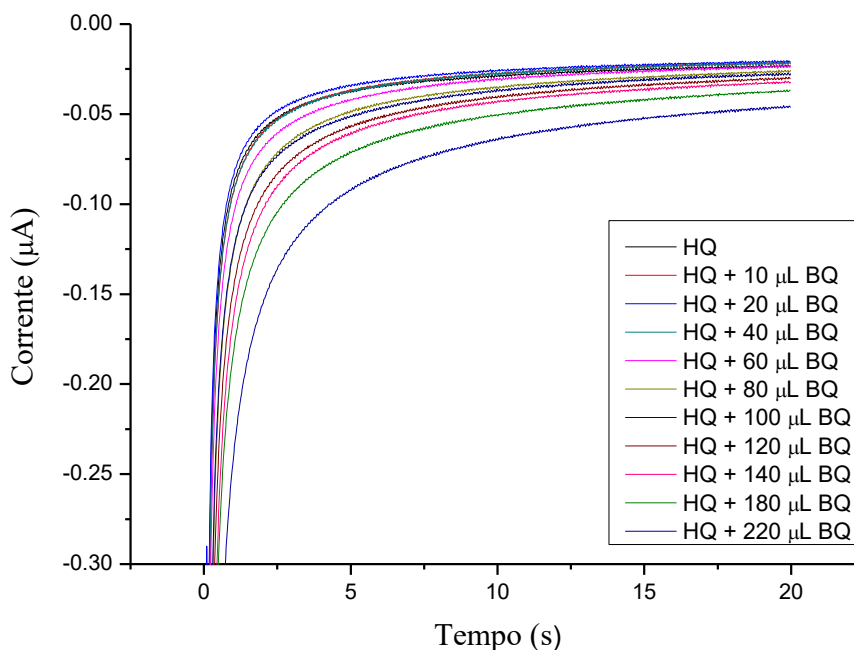
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Dessa forma, foi possível confirmar que a benzoquinona responde às condições estabelecidas para o experimento. Assim, caso estivesse benzoquinona em concentrações significativas na solução preparada a partir de cristais de hidroquinona, o sinal de corrente catódica seria visualizado.

Como comentado anteriormente, outra possibilidade para a ausência do sinal catódico seria a baixa concentração de benzoquinona no equilíbrio, abaixo do limite de detecção. A fim de verificar também essa possibilidade, novo teste foi elaborado. Desta vez mediado por cronoamperometria, técnica mais sensível e que permite a aplicação de um potencial único. Nesse caso, aplicação de um potencial fixo evita a formação de outras espécies.

A partir da análise inicial de hidroquinona a $28 \mu\text{molL}^{-1}$ foram adicionadas alíquotas de benzoquinona a $0,01 \text{ molL}^{-1}$. O procedimento completo é descrito na seção 3.2.6.3 e os dados resultantes são mostrados na **Figura 39**.

Figura 39 - Cronoamperogramas resultantes da adição de alíquotas de benzoquinona à solução de hidroquinona.

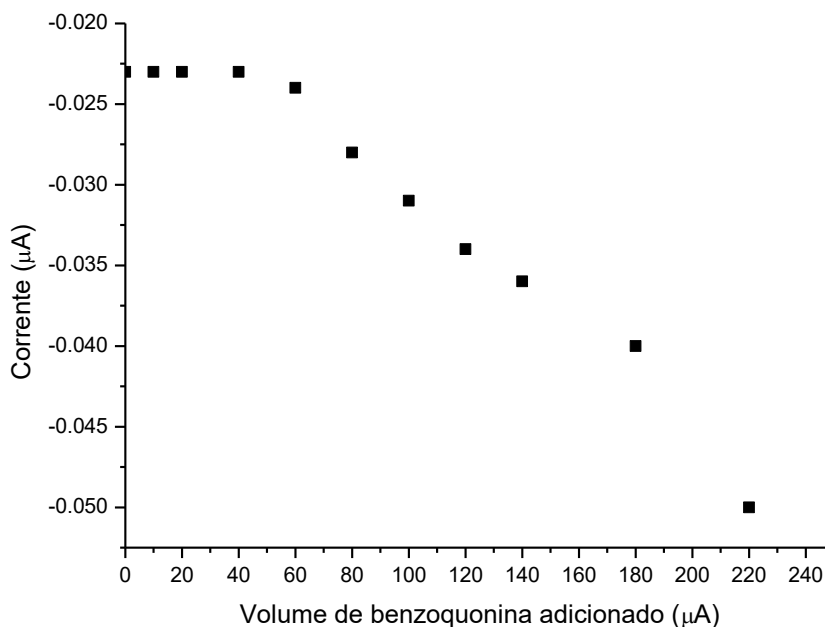


Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ e eletrodo auxiliar de platina. Potencial aplicado $-0,1 \text{ V}$.
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Destaca-se que, ainda que investigada a reação de redução nesse caso, se parte da hidroquinona em solução sofresse oxidação, sua concentração nominal seria modificada, mesmo que a presença de outras espécies não interfira na leitura do sinal de oxidação, usado para quantificar a hidroquinona. A preocupação neste momento é verificar se a solução padrão utilizada para uma análise quantitativa está adequada para tal.

O resultado do teste descrito mostrado acima (**Figura 39**) permitiu observar que mesmo após adição de algumas alíquotas de benzoquinona, o sinal de redução não pode ser observado. Verifica-se que o aumento de sinal ocorre apenas após a quinta alíquota de benzoquinona adicionada, que representa cerca de 0,04 % da concentração total de espécies em solução (**Figura 40**).

Figura 40 - Curva das alíquotas de benzoquinona adicionadas à solução de hidroquinona *versus* corrente gerada por cronoamperometria.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Diante deste resultado a conversão da hidroquinona em benzoquinona não é descartada, como poderia ter sido sugerido pelos voltamogramas cíclicos. Contudo, o percentual de oxidação não é significativo, logo, não é suficiente para interferir em uma análise quantitativa, conclusão decisiva para continuidade do trabalho.

Em relação às amostras, ainda que após submetidas à aplicação do potencial de redução característico da benzoquinona, não seja verificado o sinal de corrente correspondente, não significa que não esteja presente. Porém, se houver não é possível quantificá-la, visto que estará abaixo do limite de detecção de quantificação, logo, não está presente com uma concentração significativa.

4.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS E ELABORAÇÃO DA PROPOSTA DE QUANTIFICAÇÃO DA HIDROQUINONA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

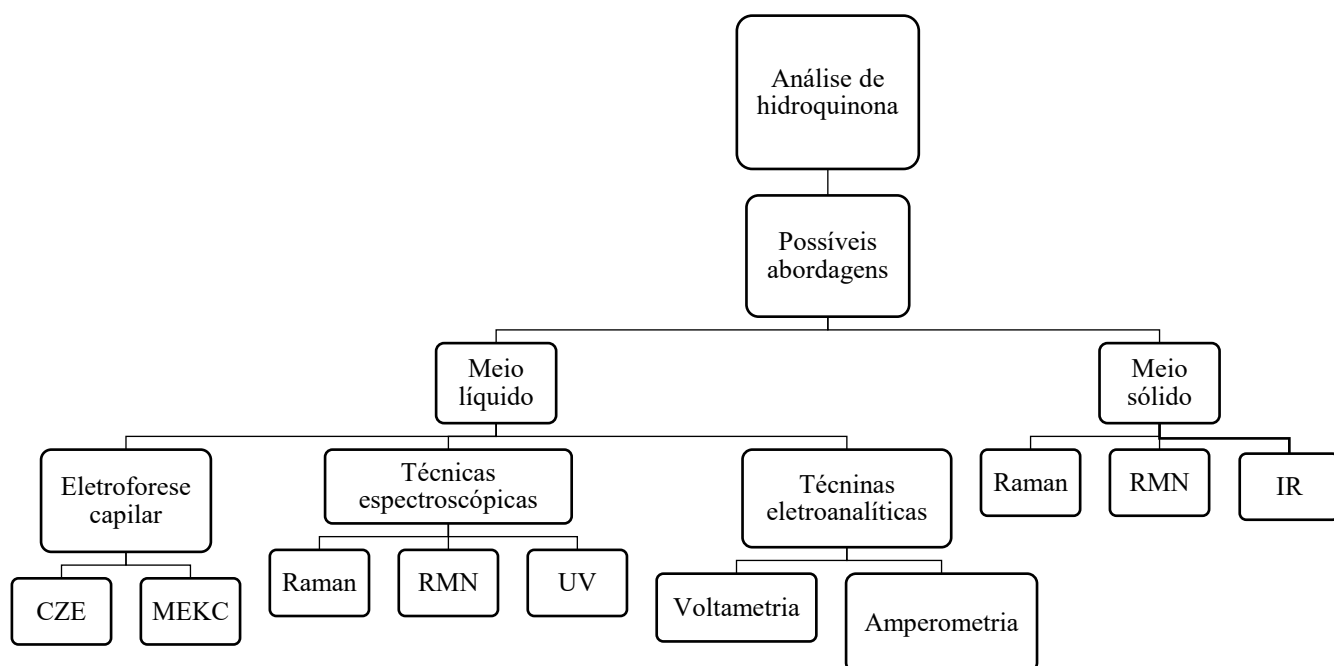
Apesar de alguns experimentos realizados se mostrarem inconclusivos, informações fundamentais para elaboração de uma proposta de quantificação foram obtidas através do estudo exploratório desenvolvido. Em geral, acredita-se que:

- a) apesar da oxidação da hidroquinona ser favorecida em meio alcalino, como amplamente descrito na literatura e confirmado pelos experimentos, a utilização de meio ácido não garante a presença de hidroquinona isolada, visto que há indícios de equilíbrio entre as espécies em toda a faixa de pH estudada desenvolvidos por eletroforese capilar;
- b) a dependência entre a reação de oxidação e o pH do meio sugere que alterações no pH da amostra durante a análise quantitativa sejam evitados;
- c) embora verificado a conversão entre as espécies em diversas técnicas utilizadas, os ensaios por técnicas eletroanalíticas sugerem também que mesmo que ocorra a oxidação da hidroquinona, e assim, tal equilíbrio não seja suficiente para inviabilizar uma análise quantitativa, devido sua baixa proporção;
- d) mesmo que não seja encontrado sinal de benzoquinona nas amostras, há a possibilidade da presença da substância, porém em proporções indetectáveis que não devem prejudicar a confiabilidade dos resultados, bem como não deve alterar as propriedades do medicamento.

Diante das respostas elaboradas para os questionamentos levantados durante o desenvolvimento do projeto, verifica-se a viabilidade da elaboração de uma proposta para a determinação quantitativa de hidroquinona em formulações farmacêuticas.

Além disso, o estudo permitiu a reunião de informações necessárias para auxiliar na seleção da técnica adequada. As técnicas mencionadas neste presente trabalho, consideradas para uma abordagem quantitativa estão sumarizadas no **Fluxograma 1**.

Fluxograma 1. Possíveis abordagens para análise quantitativa de hidroquinona.



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Os experimentos realizados em fase sólida foram capazes de caracterizar as espécies isoladamente. A priori, uma metodologia de quantificação envolvendo a espectroscopia Raman ou absorção no Infravermelho seria adequada, devido a possibilidade de trabalhar com as espécies puras. Porém, não existe no mercado medicamentos contendo hidroquinona na forma de comprimidos ou outros veículos na forma sólida. Sendo assim, o uso da técnica é inviabilizado, visto que para otimização e validação do método, padrão e amostra devem ser submetidos ao mesmo procedimento de preparo e análise.

Os demais ensaios por espectroscopia Raman em meio hidratado proporcionaram resultados positivos, porém inconclusivos, e não foram enriquecedores no esclarecimento dos questionamentos levantados. Isto posto, uma abordagem por Raman em fase líquida também foi descartada.

Os ensaios por Ressonância Magnética Nuclear em estado sólido foram satisfatórios na elucidação das estruturas e pureza das espécies. Porém, quando comparado à espectroscopia Raman, por exemplo, considerando seu uso em uma possível metodologia analítica torna-se

inviável, em decorrência da maior dificuldade e do maior tempo requerido para obtenção dos espectros, portanto, não foi considerada.

Já os ensaios por RMN em solução, mostraram-se úteis também para investigar o desdobramento das espécies, embora os resultados obtidos para a hidroquinona não tenham sido esclarecedores. Alguns testes usando solvente deuterado com ajuste de pH também foram elaborados, porém, infelizmente os resultados permaneceram inconclusivos.

A espectroscopia de absorção ultravioleta se mostrou com uma ferramenta auxiliar fundamental para identificação as espécies, sobretudo quando aliada à eletroforese capilar e suas vertentes. Apesar de não ter sido utilizada isoladamente é uma técnica simples que pode ainda ser explorada futuramente.

Em relação à eletroforese capilar, a CZE, mostrou-se inviável devido a não identificação de compostos ionizáveis. Ainda na tentativa de utilizar a eletroforese capilar, avaliou-se a viabilidade do uso da MECK, no entanto, concluído que uma metodologia deve ser elaborada seguindo o pH da amostra, ácido, a técnica não se encaixa como adequada nesses parâmetros, assim, também foi descartada.

Os resultados obtidos por eletroforese mostram ainda uma grande limitação devido a indicação do equilíbrio, acredita-se que maximizado devido a utilização de altas concentrações e altas voltagens. Alguns testes utilizando concentração baixa, semelhantes às usadas nos ensaios eletroanalíticos foram realizados, porém também se mostraram insatisfatórios.

Para utilização da CE, é necessário ainda fazer testes diferenciados, explorando outros modos de eletroforese, outros métodos de detecção e modificando condições experimentais e demais parâmetros instrumentais. Até o momento, tais experimentos não foram elaborados, porém ainda é uma das perspectivas do presente trabalho.

Neste contexto, a abordagem que se apresenta como mais seletiva e favorável para quantificação é a eletroanalítica. Os experimentos realizados por voltametria cíclica e por amperometria e cronoamperometria promoveram resultados conclusivos e esclarecedores, e ainda, a técnica não apresenta restrições quanto a escolha do meio reacional. Mesmo com a complexidade da amostra, as limitações da análise foram contornadas.

Dessa forma, deu-se prosseguimento aos experimentos referentes ao desenvolvimento, otimização e aplicação da metodologia analítica para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas.

4.5 MÉTODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CRONOAMPEROMETRIA

Escolhida a técnica, a proposta para determinação de hidroquinona em formulações farmacêuticas é o desenvolvimento e otimização de uma metodologia analítica por cronoamperometria. Os experimentos realizados nesta etapa, bem como a análise das amostras são discutidos nesta seção.

4.5.1 Desenvolvimento e otimização

De acordo com conclusões discutidas anteriormente, todos os experimentos referentes ao desenvolvimento da metodologia de quantificação foram realizados em meio aquoso tamponado pelo uso de tampão BR ajustado em pH 5.5, visto que é o pH médio em que a amostra é comercializada.

A análise de hidroquinona deu-se pela oxidação da mesma através da aplicação de um potencial fixo de 0,4 V, determinado previamente pelo voltamograma cíclico da substância em pH 5,5.

A cada adição de uma nova alíquota da solução estoque de hidroquinona à célula eletrolítica, a solução permaneceu sob agitação antes da aplicação do potencial. Encerrada a agitação, o potencial fixo foi aplicado. O procedimento otimizado foi utilizado em todos os testes discutidos abaixo e está descrito na seção 3.2.1.

Visando investigar a viabilidade do método proposto, alguns parâmetros de desempenho analítico foram determinados, são estes, seletividade, linearidade e exatidão.

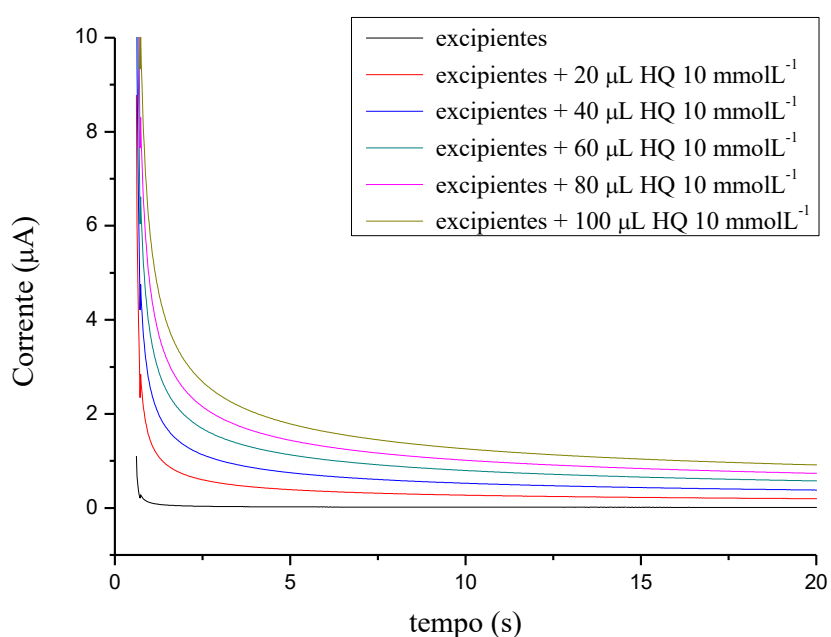
4.5.2 Seletividade

De modo a verificar possível interferência da matriz do método elaborado, um teste de seletividade foi realizado. “A seletividade de um método instrumental é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir sua determinação em uma amostra complexa. Se a seletividade não for assegurada, linearidade, exatidão e precisão estarão seriamente comprometidas.” (RIBANI *et al.*, 2004)

Dessa forma, uma réplica do medicamento na forma de gel contendo apenas os excipientes foi preparada conforme descrito na seção 3.2.10. Em seguida, uma alíquota foi preparada e submetida à análise por cronoamperometria a partir das condições otimizadas.

Posteriormente à análise da matriz isenta de hidroquinona, foram feitas adições de alíquotas da solução estoque de hidroquinona, visando uma análise comparativa dos sinais gerados a partir da análise (**Figura 41**). O procedimento é descrito na seção 3.2.8.1.

Figura 41 - Cronoamperogramas resultantes do teste de seletividade.



Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl_(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Potencial aplicado 0,4 V.
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Comparando o resultado obtido para a matriz isenta de analito com os cronoamperogramas resultantes da adição da solução estoque de hidroquinona, nota-se que não há contribuição significativa de sinal da matriz. Portanto, considera-se que o método é seletivo.

4.5.3 Linearidade

A determinação quantitativa do analito foi mediada pela construção de uma curva de calibração externa em oito níveis de concentração variando de 28,5 a 223,5 µmolL⁻¹ com incrementos de 27,5 µmolL⁻¹. A partir da solução estoque de hidroquinona 10 mmolL⁻¹

preparada em tampão BR ajustado no pH de trabalho, foram adicionadas alíquotas de 20 µL diretamente à célula eletrolítica, conforme descrito na seção 3.2.8.2.

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para obtenção da equação da curva analítica e do valor do coeficiente de correlação (r), conforme listado na **Tabela 7**.

Tabela 7 -Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação da curva de calibração externa.

Equação da curva	r
$Y = 0.0079x - 0.0235$	0.9992

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

O coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida. Quando próximo a 1, o valor indica que o ajuste feito pelo modelo é satisfatório. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação de 0,99 (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Considerando os parâmetros descritos, estima-se que a linearidade do método está adequada para aplicação do modelo na quantificação de amostras reais.

4.5.4 Exatidão

“A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência” (RIBANI *et al.*, 2004). Seleccionada pra este trabalho, a recuperação é definida como “a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada” (RIBANI *et al.*, 2004).

A ANVISA recomenda a realização de ensaios em triplicata para três níveis de concentração (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004). Assim, para o ensaio de recuperação, a foram adicionadas alíquotas da solução padrão de hidroquinona à três réplicas de amostra de modo a obter 1, 2 e 3 mmolL⁻¹ de concentração, respectivamente. As amostras foram então solubilizadas em solvente de extração adequado, sendo este o eletrólito de trabalho em 10% (v/v) de metanol, e em seguida submetidas à análise por cronoamperometria em triplicata, conforme descrito no item 3.2.8.3

O percentual de recuperação (R%) (**Tabela 8**) foi calculado de acordo com a equação (8) (FARIA *et al.*, 2008):

$$R(\%) = \frac{C_{a+p} - C_a}{C_p} \times 100 \quad (8)$$

Onde, C_{a+p} é a concentração da amostra fortificada, C_a a concentração da amostra e C_p é a concentração do padrão adicionado. A precisão das triplicatas foi estimada pelo desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*), dado pela equação (9):

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \quad (9)$$

Onde s é o desvio padrão e \bar{x} o valor médio das leituras. Em geral, métodos que quantificam compostos em quantidades macro requerem um RSD de 1 a 2% (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 8 - Valores de R (%) e RSD (%).

	Nível 1	Nível 2	Nível 3
R (%)	111	91	98
RSD (%)	0.36	0.012	0.29

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

De acordo com a RDC 166/2017 descrita pela ANVISA, recomenda-se que os valores de recuperação estejam próximos a 100%, admitindo que a recuperação seja precisa. Para fármacos, recomenda-se que estejam inseridos entre 90 a 110% (BRASIL, 2017; RIBANI *et al.*, 2004)

Nota-se que os valores de R (%) encontram-se próximos da faixa recomendada, bem como, a precisão de cada réplica também está abaixo do limite aceitável. Portanto, considera-se que exatidão do método como satisfatória.

4.5.5 Análise das amostras

Assegurada a viabilidade do método, um medicamento caracterizado como desmelenizante contendo 4% (m/m) de hidroquinona comercializado na forma de gel, foi utilizado como amostra para esse trabalho.

Inicialmente a amostra foi preparada pela solubilização de uma alíquota no eletrólito de trabalho, sendo este a solução tampão Br em pH 5,5, com auxílio de banho ultrassônico. Em seguida, alíquotas de 35 μ L foram adicionadas à célula eletrolítica contendo 7 mL do eletrólito e submetidas à análise por cronoamperometria a partir das condições otimizadas descritas na seção 3.2.7. O procedimento foi realizado em triplicata. O resultado é indicado na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Valores referentes ao doseamento da amostra de hidroquinona em gel dermatológico preparada em eletrólito.

Conc. Média HQ (% m/m)	2,91 %
RSD (%)	2,09 %

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Apesar de mostrar-se uma análise precisa, visto o valor de RSD (%), o valor nominal determinado, 2,9 % (m/m), encontra-se distante do valor declarado no rótulo 4 % (m/m). A fim de verificar se o baixo valor encontrado foi em decorrência de problemas no preparo de amostra, outra abordagem para o procedimento foi testada.

Baseado em metodologia desenvolvida por Gao (2011) acrescentou-se 10% de metanol (MeOH) no momento da diluição da amostra. O solvente orgânico ajuda a promover a completa dissolução do gel, assim, toda hidroquinona contida no produto estará disponível para análise. O autor utiliza uma porção de 60 % de metanol em seu solvente de extração, no entanto, em virtude do ajuste de pH optou-se pelo uso de um baixo percentual, de modo a não prejudicar a manutenção do pH fixo.

A nova amostra foi então solubilizada em solução tampão pH 5,5 e 10 % de metanol (v/v) e analisada em triplicata por cronoamperometria a partir das condições otimizadas descritas na seção 3.2.7. Os resultados são listados na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Avaliação comparativa dos resultados de doseamento de hidroquinona em gel dermatológico em amostras preparadas com e sem metanol.

Teste sem MeOH		Teste com MeOH	
Conc. Média HQ (% m/m)	2,91 %	Conc. Média HQ (% m/m)	3,81 %
RSD (%)	2,09 %	RSD (%)	0,21 %

Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Nota-se que o preparo com pequeno percentual de solvente orgânico de fato auxiliou na diluição do gel, conforme observado também durante a realização dos procedimentos experimentais, e permitiu uma análise de maior confiabilidade, além de promover um resultado

de maior precisão. Assim, optou-se por utilizar tal metodologia de preparo nos experimentos de quantificação. Destaca-se que os ensaios de recuperação mencionados no item 4.5.4 também seguiram o procedimento de preparo otimizado supracitado.

Dando prosseguimento as análises, outras réplicas autênticas foram preparadas de acordo com o procedimento otimizado e analisadas em triplicata, conforme descrito na seção 3.2.9. Os resultados são listados na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Valores de quantificação da hidroquinona em amostras de gel dermatológico por procedimento otimizado.

	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Valores médios entre réplicas autênticas
Conc. Média HQ (% m/m)	3,81 %	3,30 %	3,76 %	3,62 %
RSD (%)	0,21	1,7	2,5	1,47 %

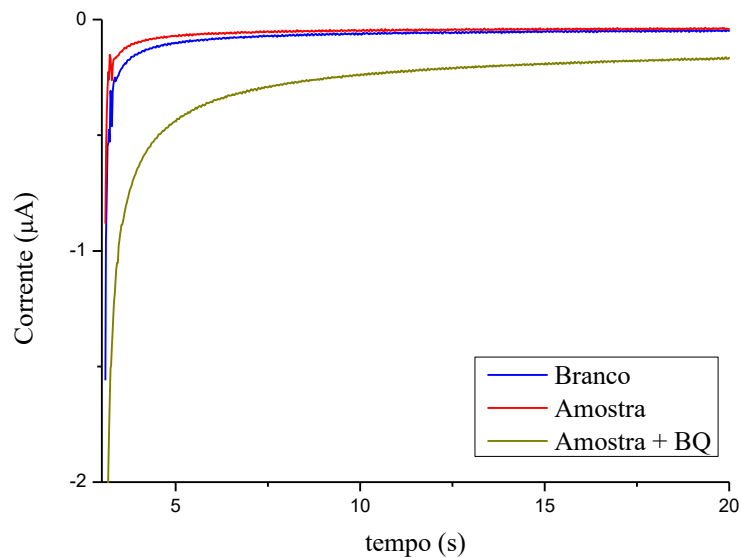
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Em geral, os valores de percentual de hidroquinona encontrados na amostra variam de 3,3 a 3,8 % (m/m), intervalo que se encontra próximo ao declarado no rótulo do produto.

Por fim, uma alíquota da amostra foi novamente preparada e submetida à análise por cronoamperometria com aplicação do potencial de redução da benzoquinona, 0,1 V. Este teste foi elaborado para concluir os estudos sobre a degradação do princípio ativo do medicamento, e verificar a se há a presença ou não da benzoquinona nas amostras.

O teste foi realizado conforme o procedimento descrito na seção 3.2.9 apenas com a alteração do potencial aplicado. Após análise da amostra, foi adicionada e analisada ainda uma alíquota de benzoquinona, a fim de gerar um dado comparativo (**Figura 42**).

Figura 42 - Cronoamperograma resultante da redução da amostra de gel dermatológico contendo hidroquinona.



Condições experimentais: eletrodo de trabalho de carbono vítreo, eletrodo de referência Ag/AgCl(sat) e eletrodo auxiliar de platina. Potencial aplicado $-0,1$ V.
Fonte: Elaborado pela autora (2020).

Como comentado anteriormente, mesmo que a amostra não tenha registrado um sinal de redução no cronograma (Figura 42), a presença de benzoquinona não é completamente descartada, porém não é quantificável, visto que se mostra ausente ou abaixo do limite de detecção.

Diante dos resultados obtidos, das técnicas descritas neste trabalho acredita-se que a cronamperometria é a técnica analítica mais adequada para a determinação de hidroquinona, sobretudo em virtude das considerações sobre a degradação aqui relatadas.

Alguns parâmetros de desempenho analítico foram verificados com o propósito de avaliar a viabilidade do uso do método desenvolvido, assim, em vista dos resultados quantitativos descritos nesta seção, a metodologia mostra-se promissora. Como perspectiva, pretende-se aprofundar o tratamento estatístico dos dados e validar o método proposto.

5 CONCLUSÃO

Em geral, o trabalho desenvolvido elucidou alguns questionamentos originados durante sua realização, sobretudo sobre a estabilidade do analito. Possibilitou também a elaboração de uma proposta de quantificação de hidroquinona em amostras comercializadas em mercado local, seguindo o objetivo de trabalho. Visto que é uma substância controlada, a proposta do desenvolvimento de uma metodologia inequívoca capaz de determinar o teor do princípio ativo, bem como sua estabilidade, é justificada.

Ainda que alguns testes não tenham sido totalmente esclarecedores, pode-se criar um panorama sobre o comportamento do analito frente algumas modificações do meio reacional, seja na substância pura certificada ou na amostra, e como este se relaciona com aspectos toxicológicos do produto.

Durante a realização do projeto, diversas ferramentas analíticas foram exploradas com a intenção não só de investigar o analito, bem como avaliar a melhor abordagem a ser adotada para o doseamento eficiente. De acordo com os resultados descritos ao longo do trabalho, as medidas espectroscópicas auxiliaram no estudo investigativo, iniciado pelo uso das técnicas de eletromigração.

Por fim, uma abordagem usando medidas eletroanalíticas foram decisivas na tomada de decisão no que se refere à finalização do trabalho. Através da técnica, pode-se concluir que mesmo que haja benzoquinona na amostra, a concentração deve ser indetectável, ou seja, a proposta de uma metodologia para quantificação de benzoquinona não é necessária. Além disso, ainda que as espécies em questão se mantenham em equilíbrio quando em solução, isso não influencia significativamente na elaboração de um procedimento de quantificação.

Diante dessa conclusão, a cronoamperometria foi a ferramenta analítica selecionada. Isto posto, foi possível desenvolver, otimizar um método de determinação de hidroquinona eficiente, sensível, seletivo e de fácil implementação. E ainda, alguns parâmetros de desempenho analítico foram estudados. Os resultados obtidos foram satisfatórios e indicaram a viabilidade do uso do método.

Foi feito ainda uma otimização do procedimento de preparo de amostra, este que se mostrou fácil, rápido e que pode ser aplicado a outros métodos que fazem uso das demais técnicas analíticas aqui citadas, entre outras.

Por fim, o trabalho desenvolvido nos dois anos referentes à conclusão do curso de Mestrado em Química com ênfase em Química Analítica, proporcionou o treinamento do

discente em uma plataforma instrumental multidisciplinar. E os resultados e conhecimentos aqui obtidos poderão ser aplicados à novos trabalhos a serem desenvolvidos dentro do grupo.

Como perspectivas, pretende-se ainda verificar outros parâmetros estatísticos de desempenho analítico do método aqui proposto. Bem como, realizar ainda outros testes visando adequar as técnicas de eletromigração, propostas a priori, de modo a viabilizar uma nova metodologia de doseamento alternativa. Além da publicação dos resultados em revistas especializadas de grande impacto da área.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. S; ELGOBASHY, M. R; BEBAWY, L. I; SHOKRY, R. F. Stability-indicating chromatographic determination of hydroquinone in combination with tretinoin and flucinolone acetonide in pharmaceuticals formulations with a photodegradation kinetic study. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 43178-43194, 2015.
- ABRAHAM, I; JOSHI, R; PARDASANI, P; PARDASANI, R. T. Recent advances in 1,4-benzoquinone chemistry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 3, 2011.
- ANDRADE, L. S; LAURINDO, E. A. OLIVEIRA, R. V; ROCHA-FILHO, R. C; CASS, Q. B. Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photochemical treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 369-373, 2006.
- BAKER, D. R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- BAUR, J. E. Diffusion Coefficients. In: ZOSKI, C. G. **Handbook of electrochemistry**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p. 830-848, 2007.
- BIAN, L; ZONG, H; LI, C; ZANG, J; WANG, Y; ZHANG, D; LI, Y. Amperometric determination of hydroquinone and catechol based on nanodiamond power electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 14, p. 186-195, 2019.
- BIELICKA-DASZKIEWICZ, K; HADZICKA, M; VOELKEL, A. Optimization of SPE/GC/HPLC analytical procedure for determination of phenol, quinones, and carboxylic acids in water samples. **International Scholarly Research Network Chromatography**, p. 1-7, 2012.
- BOLTON, J. L; TRUSH, M. A; PENNING, T. M; DRYHURST, G; MONKS, T. J. Role of quinones in toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 136-160, 2000.
- BORGES, R. S; COSTA, F. M; PEREIRA, T. L; ARAÚJO, R. L; ALMEIDA, E. D; SILVA, A. B. F; N-acetyl-cysteine increases chemical stability of hydroquinone in pharmaceuticals formulations: a theoretical and experimental approach. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 3, p. 609-614, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2, 6ª ed. Brasília, DF, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 83. **Regulamento técnico MERCOSUL sobre a lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes**. 20 de junho de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 3. **Regulamento técnico**: Lista de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas. 18 de janeiro de 2012a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**. 2ª ed. Brasília, DF, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 166. **Validação de métodos analíticos**. 24 de julho de 2017.

BREAUX, J; JONES, K; BOULAS, P. Understanding and implementing efficient analytical methods development and validation. **Pharmaceutical Technology Analytical Chemistry and Testing**, p. 6-13, 2003.

CALAÇA, G. N; STETS, S; NAGATA, N. Determinação simultânea de ácido kójico, e hidroquinona por espectrofotometria visível e calibração multivariada. **Química Nova**, v. 34, p 630-635, 2011.

CHAUHAN, A; MITTU, B; CHAUHAN, P. Analytical method development and validation: A concise review. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**, 2015.

CHUNG, M. Y; LAZARO, R. A; LIM, D; JACKSON. J; LYON, J; REDUNLIC, D; HASSON, A. S. Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 4880-4886, 2006.

CUNHA, R. R; TORMIN, T. F; RICHTER, M; MUNOZ, R. A. A. Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 663-668, 2013.

DADZIE, O. E; PETIT, A. Skin bleaching: highlighting the misuse of cutaneous depigmenting agents. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, p. 741-750, 2009.

DAS, A; CHAKRABARTY, S; CHOUDHURY, D; CHAKRABARTI, G. 1,4-benzoquinone (PBQ) induced toxicity in lung epithelial cells is mediated by the disruption of microtubule network and activation of caspase-3. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1054-1066, 2010.

DAVIES, M; PRICHARD, F. E. Vibrational frequency assignment and molecular structure of p-benzoquinone. **Transactions of the Faraday Society**, 1963.

DESIDERIO, C; OSSICINI, L; FANALI, S. Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 887, p. 489-496, 2000.

DO, H; KANG, E; YANG, B; CHA, H. J; CHOI, Y, S. A tyrosinase, mTyr-CNK, that is functionally available as a monophenol monooxygenase. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-8, 2017.

DRAELOS, Z. D. Skin lightening preparations and hydroquinone controversy. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 308-313, 2007.

DRAELOS, Z. D; YATSKAYER, M; BHUSHAN, P; PILLAI, S; ORESAJO, C. Evaluation of a kojic acid, emblica extract and glycolic acid formulation compared whit hydroquinone 4% of skin lightening. **Therapeutics for the clinician**, v. 86, p. 153-158, 2010.

DREHER, F; DRAELOS, Z. D; GOLD, M. H; GOLDMAN, M. P; FABI, S. G; LUPO, M. L. P. Efficacy of hydroquinone-free skin-lightening cream for photoaging. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 12, p. 12-17, 2013.

ELGRISHI, N; ROUNTREE, K. J; McCARTHY, B. D; ROUNTREE, E. A; EISENHART, T. T; DEMPSEY, J. L. A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 95, p. 197-206, 2018.

ESTEKI, M; NOUROOZI, S; SHAHSAVARI, Z. A fast and direct spectrophotometric method for simultaneous determination of methyl paraben and hydroquinone in cosmetic products using successive projections algorithm. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, p. 25-34, 2016.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a Capillary Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389-396, 2008.

FLORES-DÍAZ, N; SOTO-NAVARRO, A; FREITAG, M; LAMOUREUX, G; PINEDA, L. W. Neutral organic redox pairs based of sterically hindered hydroquinone/ benzoquinone derivatives for dye-sensitized solar cells. **Solar Energy**, v. 167, p. 76-83, 2018.

GALIMANY-ROVIRA, F; PÉREZ-LOZANO, P; SUÑÉ-NEGRE, J; GARCÍA-MONTOYA, E; MIÑARRO, M; TICÓ, J. R. Development and validation of a new RP-HPLC method for simultaneous determination of hydroquinone, kojic acid, octinoxate, avobenzone, BHA, and BHT in skin-whitening cream. **Analytical Methods**, v. 8, p 1170-1180, 2016.

GAMBOA-VALERO, N; ASTUDILLO, P. D; GONZÁLEZ-FUENTES, M. A; LEVYA, M, A; ROSALES-HOZ, M, J; GONZÁLEZ, F, J. hydrogen bonding complexes in the quinone-hydroquinone system and the transition to a reversible two-electron transfer mechanism. **Electrochimica Acta**, v. 188, p. 602-610, 2016.

GAO, W; LEGIDO-QUIGLEY, C. Fast and sensitive performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4307- 4311, 2011.

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

GARCÍA, P. L; SANTORO, M. I. R. M; SINGH, A. K; KEDOR-HACKOMANN, E. R. M; Determination of optimum wavelength and derivative order in spectrophotometry for quantitation of hydroquinone in creams. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 397-404, 2007.

GHANBARZADEH, S; HARIRI, R; KOUHSOLTANI, M; SHOKRI, J; JAVADZADEH, Y; HAMISHEHKAR, H. Enhanced stability and dermal delivery of hydroquinone using solid liquid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1004-101, 2015.

HANCU, G; SIMON, B; RUSU, A; MIRCIA, E; GYÉRESI, Á. Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2013.

HANDEL, A. C; MIOT, L. D. B; MIOT, H. A. Melasma: a clinical and epidemiological review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 89, n. 5, p. 771-82, 2014.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 8th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.

HARVEY, D. **Modern analytical chemistry**. 1st ed. The McGraw-Hill Companies, 2000.

HAYASHI, N; MATSUI, K; KANDA, A; YOSHIKAWA, T; NAKAGAWA, H; YOSHINO, J; HIGUCHI, H. Exchange of quinone and hydroquinone moieties in mixed solutions of biquinone and bihydroquinone. **Chemistry Letters**, v. 40, p. 947-949, 2011.

HUIYING, W; RUIYI, L; ZAIJUN, L. Nanohybrid of Co₃O₄ and histidine-functionalized graphene quantum dots for electrochemical detection of hydroquinone. **Electrochimica Acta**, v. 255, p. 323-334, 2017.

JÚNIOR, V. L; CONSTANTINO, M. G; SILVA, G. V. J; NETO, A. C; TORMENA, C. F. NMR and theoretical investigation of the keto-enol tautomerism in cyclohexane-1,3-diones. **Journal of Molecular Structure**, v. 828, p. 54-58, 2007.

KARIMKHANI, C; DELLAVALLE, R. P; COFFENG, L. E; FLOHR, C; HAY, R. J; LANGAN, S. M; NSOESIE, E. O; FERRARI, A. L; ERSKINE, H. E; SILVERBERG, J. I; VOS, T; NAGHAVI, M. Global skin disease morbidity and mortality: An update from global burden of disease study 2013. **JAMA Dermatology**, v. 153, n. 5, p. 404-412, 2017.

KUBIYNI, M. J; KERESZTURY, G. Infrared and Raman Spectra of Hydroquinone Crystalline Modifications. **Microchimica Acta**, v. 14, p. 525-528, 1997.

LEFROU, C. FABRY, P. POIGNET, J. **Electrochemistry: the basics with examples**. New York: Springer, 2012.

LEVITT, J. The safety of hydroquinone: a dermatologist's response of the 2006 Federal register. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, 2007.

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

LIN, Y; YANG, Y; WU, S. Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid, and hydroquinone in cosmetics. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 279-282, 2007.

MATSUMOTO, M; TODO, H; AKYIAMA, T; HIRATA-KOIZUMI, M; SUGIBAYASHI, K; IKARASHI, Y; ONO, A; HIROSE, A; TOKOYAMA, K. Risk assessments of skin lightening cosmetics containing hydroquinone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 81. P. 128-135, 2016.

MEYS, R. Skin pigmentation. **Medicine**, v. 45, n. 7, p. 438-443, 2017.

MIOT, L. D. B; SILVA, M. G; MIOT, H. A; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 623-635, 2009.

- MO, G; HE, X; ZHOU, C; YA, D; FENG, J; YU, C; DENG, B; Sensitive detection of hydroquinone based on electrochemiluminescence energy transfer between the excited ZnSe quantum dots of benzoquinone. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 266, P. 784-792, 2018.
- MOLDOVAN, Z; POPA, D. E; DAVID, I. G; BULEANDRA, M; BADEA, I. A. a derivative spectrometric method for hydroquinone determination in the presence of kojic acid, glycolic acid and ascorbic acid. **Journal of Spectroscopy**, v. 2017, p. 1-9, 2017.
- MOLNAR-PIER, I; TISZA, S; KOROS, E; KURIN-CSÖRGEL, K; SZALAI, I. GC/MS quantitation of hydroquinone, 1,4-benzoquinone, and 1,4-cyclohexadione: one by one and simultaneously. **Journal of Separation Science**, v. 18, p. 749-752, 1995.
- MONGAY, C; CERDA, V. A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. **Annali di Chimica**, v. 74, p. 409-412, 1974.
- MONK, P. M. S. **Fundamentals of electroanalytical chemistry**. England: John Wiley & Sons, 2001.
- MONKS, T. J; HANZLIK, R. P; COHEN, G. M; ROSS, D; GRAHAM, D, G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 112, p. 2-16, 1992.
- NAGARAJA, C; VENKATESHA, T. V. The influence of electron donating tendency on electrochemical oxidative behavior of hydroquinone: experimental and theoretical investigations. **Electrochimica Acta**, v. 260, p. 221-234, 2018.
- NAIK, S. K; SWAMY, K. Modification of paste carbon paste electrode by electrochemical polymerization of neutral red and its catalytic capability towards the simultaneous determination of catechol and hydroquinone: a voltammetry study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 804, p. 78-86, 2017.
- NICOLAIDOU, E; KATSAMBAS, A. D. Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. **Clinics in Dermatology**, v. 32, p. 66-72, 2014.
- NORDLUND, J. J. Hyperpigmentation: its historical treatment and the development of hydroquinone. **Journal of Pigmentary Disorders**, v. 2, n. 11, p. 1-5, 2015.
- NORDLUND, J. J; GRIMES, P. E; ORTTONE, J. P. The safety of hydroquinone. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, p. 781-787, 2006.
- OLIVEIRA, L. J. N; ROCHA, I. M; GUILLO, L. A. Ensaio radiométrico da tirosinase. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 1 p. 5-6, 2004.
- OLIVEIRA, M. A. L; SOARES, D. C; TOSTES, G. S; GUIMARÃES, M. C; VAZ, F. A. S. Optimization of an alternative methodology for simultaneous analysis of nitrite and nitrate in water for urban stream by capillary electrophoresis under direct UV detection. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 484-490, 2012.
- ORTONNE, J; PASSERON, T. Melanin pigmentary disorders: treatment update. **Dermatologic Clinics**, v. 23, p. 209-226, 2005.

PACHECO, W. F; SEEMAN, F. S; ALMEIDA, V, G, K; RITTA, A. G. S. L; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: uma breve revisão sobre conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PANKTI, D; KUSUM, M; MEHUL, P. Development and validation of UV-Visible spectrophotometric method for simultaneous estimation of mometasone furoate, hydroquinone and tretinoin from their pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 21, n. 49, p. 296-300, 2013.

PARVEZ, S; KANG, M; CHUNG, H; CHO, C; HONG, M; SHIN, M; BAE, H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 921-934, 2006.

PAVIA, D. L; LAMPMAN, G. M; KRIZ, G. S; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**: tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, P. ENGUITA, F. J; FERREIRA, J; LEITÃO, A. L. DNA damage induced by hydroquinone can be prevented by fungal detoxification. **Toxicological Reports**, v. 1, p. 1096-1105, 2014.

PUBCHEM. **1,4-Benzoquinone**. Disponível em:
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Benzoquinone. Acesso: 23/03/2020.

PUBCHEM. **Hydroquinone**. Disponível em
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroquinone>. Acesso: 26/07/2019a.

PUBCHEM. **Methanol**. Disponível em
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol>. Acesso: 26/07/2019b.

RAIMUNDO, I. M; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, 1997.

RAJKUMAR, Y; DIVYA, Y; RAKESH, Y. Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of tazarotene and hydroquinone in their gel formulation by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 467-471, 2019.

RAMSDEN, C. A; RILEY, P. A. Mechanistic aspects of the tyrosinase oxidation of hydroquinone. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 2463-2464, 2014.

RIBANI, M; BOTOLLI, C. B. G; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F; MELO, L. F. C. Validação em métodos analíticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBAS, J. CAVALCANTE. M. S. M. Ocronose exógena induzida por hidroquinona: relato de quatro casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p.699-703, 2010.

RIVZI, S. A. A; DO, D. P. SALEH, A. M. Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). **European Journal of Chemistry**, v. 2, n. 2. P. 276-281, 2011.

RODRIGUES, A. G; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementariedades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, 2012.

ROWE, R. C; SHESKEY, P. J; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th edition. Washington: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

SAKODINSKAYA, I, K; DESIDERIO, C; NARDI, A; FANALI, S. Micellar Electrokinetic chromatography study of hydroquinone and some of its ethers. **Journal of Chromatography**, v. 596, p. 95-100, 1992.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2^a ed. São Paulo: Editora Unesp, 2008.

SBD. **Fotoenvelhecimento**: o que é, tratamentos e novidades. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/noticias/fotoenvelhecimento-o-que-e-tratamentos-e-novidades>. Acesso: 19/04/2020a.

SBD. **Melasma**. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/melasma/13/>. Acesso: 19/04/2020b.

SBD. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 549-558, 2006.

SBD; MIOT, H. A; PENNA, G. O; RAMOS, A, M. C; PENNA, M. L. F; SCHMIDT, S. M; LUZ, F. B; SOUSA, M. A. J; PALMA, S. L. L; JUNIOR, J. A. S. Profile of dermatological consultations in Brasil (2018). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 6, p. 916-928, 2018.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical methods**: guide to experiments and applications. New York: Springer, 2002.

SCHWARTZ, C; JAN. A; ZITO, P. M. **Hydroquinone**. In: StatPearls. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539693/>. Acesso: 10/01/2020.

SEGATO, M. P; SILVA, C. R; JARDIM, I. C. S. F. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 431-440, 2009.

SETH, D; CHELDIZE, K; BROWN, D; FREEMAN, E. F. Global burden of skin disease: Inequities and innovations. **Current Dermatology Reports**, v. 6, n. 3, p. 204-210, 2017.

SHAI DAROVA, L. G; GEDMINA, A. V; BUDNIKOV, G. K. Voltammetry of benzoquinone-hydroquinone redox couple at electrodes modified with a polyvinylpyridine film doped with cobalt phthalocyanine. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 171-175, 2003.

SHIM, Y; PARK, S. Spectroelectrochemical studies of *p*-benzoquinone reduction in aqueous media. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 425, p. 201-207, 1997.

SIDDIQUE, S; PARVEEN, Z; ALI, Z; ZAHEER, M. Qualitative and quantitative estimation of hydroquinone in skin whitening cosmetics. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 2, p. 224-228, 2012.

SILVA, M. N; FERREIRA, V. T; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F. X; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIRAKI, A. G; CHAN, T. S; O'BRIEN, P. J. Application of quantitative structure-toxicity relationships for the comparison of the cytotoxicity of 14 *p*-benzoquinones congeners in primary cultured rat hepatocytes versus PC12 cells. **Toxicological Sciences**, v. 81, p. 148-159, 2004.

SKOOG, D. A; HOLLER, J. E; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 6th ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007.

SKOOG, D; WEST, D; HOLLER, J; CROUCH, S. **Fundamentos de química analítica**: Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo: Thomson, 2005.

SMITH, E; DENT, G. **Modern Raman spectroscopy: a practical approach**. Sussex: John Wiley & Sons, 2008.

SNYDER, R; HEIDI, C. C. An overview of benzene metabolism. **Environmental Health Perspective**, v. 104, p. 1165-1171, 1996.

SOLOMONS, T. W; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. Rio de Janeiro, LTC, 2009.

SOUSA, E. T; LOPES, W. A; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

SPUDEIT, A. D; DALZAN, M. D; MICKE, G. A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

STAGGE, S; CAVKA, A; JÖNSSON, L. J. Identification of benzoquinones in pretreated lignocellulosic feedstocks and inhibitory effects on yeast. **AMB Express**, v. 62, 2015.

STRATFORD, M. R L; RAMSDEN, C, A; RILEY, P. A. The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 4364-4370, 2012.

TARAN, O. Electron transfer between electrically conductive minerals and quinones. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. 49, p. 1-13, 2017.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p.493-511, 1997.

THÉOPHILE, K; IGNAS, T. K; FRANÇOIS, E. Y. Electrochemical analysis of hydroquinone using glassy carbon electrode coated with a clay film amended by L-cysteine. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 64-77, 2013.

TOOMULA, N; KUMAR, A; KUMAR, S; BHEEMIDI, S. Development and validation of analytical methods for pharmaceuticals. **Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques**, p. 2-5, 2011.

TOSSEL, J. A. Quinone-hydroquinone complexes as model components of humic acids: theoretical studies of their structure stability and visible-UV spectra. **Geochimica et cosmochimica Acta**, v. 73, p. 2023-2033, 2009

TURKAY, O; BARISCI, S; OZTURK, H; OZTURK, B; SEKER, M, G. Toxicological profile of 1,4-benzoquinone and its degradation by products during electro-fenton, electrocoagulation, and electrosynthesized Fe (VI) oxidation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 144, n. 12, 2018.

USA. Food and Drug Administration. **Bulk drug substances nominated for use in compounding under section 503B of the federal food, drug, and cosmetic act**. Updated March 23, 2020.

USA. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. **Hydroquinone**: nomination profile. May, 21, 2009.

USA. **United States Pharmacopeia. USP 36**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2012.

VAZ, F. A. S; SILVA, P. A; PASSOS, L. P; HELLER, M; MICKE, G. A.; COSTA, A. C. O, OLIVEIRA, M. A. L. Optimization of a capillary zone electrophoresis methodology for simultaneous analysis of organic aliphatic acids in extracts of *Brachiaria brizantha*. **Phytochemical Analysis**, 2012.

VOETEN. R. L. C; VENTOURI, I. K; HASELBERG, R; SOMSEN, G. W. Capillary Electrophoresis: Trend and Recent Advances. **Analytical Chemistry**, v. 90, p. 1464-1481, 2018.

VOLLHARDT, P; SCHORE, N. **Organic chemistry**: Structure and Function. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2009.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

WESTER, R. C; MELENDRES, J; HIU, X; COX, R; SERRANZANA, S; ZHAI, H; QUAN, D; MAIBACH, H. I. Human in vivo and in vitro hydroquinone topical bioavailability, metabolism, and disposition. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 54, p. 301-317, 1998.

YAMAGUCHI, Y; HEARING, V. J. Melanocytes and their diseases. **Cold Spring Harbor Perspective in Medicine**, v. 4, p. 1-18, 2014.

ZAIDAN, L. E. M. C; NAPOLEÃO, D. C; GUIMARÃES, G; BARBOSA, C. M. B. M; BENACHOUR, M; SILVA, V. L. Validation methodology for identification and measurement of phenolic compounds in oil refinery effluent by HPLC. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 7, n. 3, p. 95-106, 2013.

ZHANG, Y; ZHENG, J. B. Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52f, p. 7210-7216, 2007.