

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

**“Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína,
Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com
detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).”**

RAFAEL RODRIGUES CUNHA

Dissertação de Mestrado

Orientador

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

Uberlândia

Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

**“Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína,
Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecção
condutométrica sem contato (CE-C⁴D).”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Aluno: Rafael Rodrigues Cunha

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia

Fevereiro de 2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 163/COPGQ.

DATA: 27/02/2013

DISCENTE: Rafael Rodrigues Cunha

MATRÍCULA: 11112QMIO12

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de métodos rápidos de determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato CE C⁴D.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas usando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato.

Às quatorze horas do dia vinte e sete de fevereiro do ano dois mil e treze, no Auditório 50-E do Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Wendell Karlos Tomazelli Coltro, da Universidade Federal de Goiás, Alam Gustavo Trovó, do Instituto de Química da UFU e Eduardo Mathias Richter, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será mantido o mesmo.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 16 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Wendell K. T. Coltro

Prof. Dr. Wendell Karlos T. Coltro – UFU

Alam Gustavo Trovó

Prof. Dr. Alam Gustavo Trovó – IQUFU

Eduardo Mathias Richter

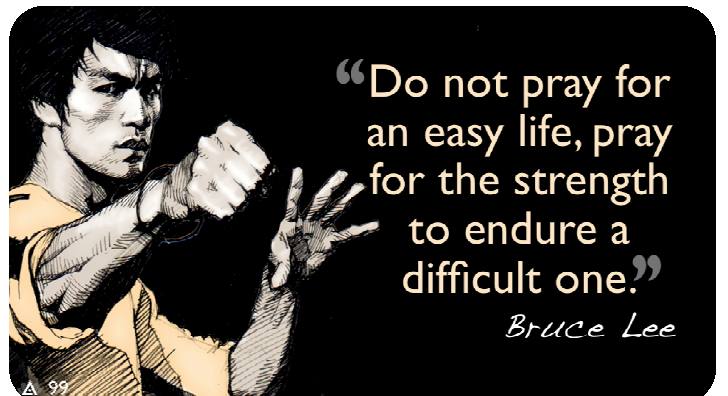
Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter – IQUFU

Universidade Federal de Uberlândia - Avenida João Naves de Ávila, nº 2121, Barro Santa Mônica - 38.408-144 - Uberlândia - MG

+55 - 34 - 3235-4165

incoquimica@ufu.br

http://www.incoquimica.ufu.br



Agradecimentos

- A Deus, por estar sempre presente, me fornecendo força e paciência para sempre seguir em frente e iluminando o caminho que percorro em minha vida.

- A toda minha Família, vivos ou não, residentes em Uberlândia ou em qualquer parte do mundo, por terem feito os moldes nos quais eu cresci e aprendi com a vida. Pela presente motivação, ajuda e carinho! Mamãe Gislaine, Paizão Antônio Carlos, Mamãe Marília, “Mana” Larissa, Cunhadão Diego, muito obrigado por tudo! Sempre terão meu eterno amor e respeito.

- Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, pelas horas dedicadas a me ensinar, pela paciência e incentivo, pela confiança em mim depositada, pelos conselhos e pela amizade oferecidos dentro e fora do laboratório.

- Ao prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, também pelos ensinamentos e todas as contribuições para meu crescimento, além do apoio e amizade.

- A todos os amigos dos laboratórios de pesquisa do IQ-UFU, pela amizade, respeito e por todos os momentos de descontração, que fizeram as duras e longas horas de trabalho mais macias e divertidas, pela ajuda nas discussões e pela troca de experiências. Especialmente aos membros

do Nupe: Rodrigo (Banana), Mariana (Mari), Polyana P. (Poly “Pereirão”), Denise, Polyana L. (Poly), Monike, Flávia, David (Granola), Thiago (Tormin), Luiz André (Sô), Michelle, Ana, Jéssica, Renata, José Reinaldo (Zé), Rafael Z. (Zaqueo), Rafael M. (Chará), Weberson, Fernanda e Alexandre, Dudu; aos que já foram do Nupe também especialmente Rodrigo (Cabeça). Desejo a todos toda a felicidade possível, além de uma vida pessoal e profissional repleta de realizações e sucesso!

- Aos amigos da graduação, Abílio, Vitão (Urso), João (Jão Barraca), Rodrigo (Frango), Tevez, Léo, Dani, Jú, Patrícia, Lorena, Éverton, Ênio, Tamiris (Japa), Hélen, Sabrina, Flávinha, Wilson, Hudson (Marieta), Cazeca, Pão de Queijo, Pé de Pano, Flor, Renato (Lindo), Natan, Robert (e Ana), Richard, Débora (e Breno), Cacála, Jiló e Raphael (PH).

- Aos amigos de infância (_CoT_), Baguete, Pitoco, Tião, Frango, Fernandão e Marcão; e aos amigos da vida (D’Lari), Mãozão, Pena, Felipe, Maurinho, Gustavinho, Pedrin e Guinther; os quais sempre estiveram ao meu lado, pro que der e vier. Todos possuem minha recíproca e eterna confiança.

- Às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelas bolsas de Iniciação Científica e de Mestrado, pelos auxílios financeiros nos projetos e nos congressos em que participei.

- *Ao Instituto de Química pelo espaço concedido e aos seus funcionários pela paciência, colaboração e amizade.*

Índice

| | |
|---|-----|
| Resumo..... | i |
| Abstract | iii |
| Lista de abreviações | v |
| | |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Breve histórico sobre eletroforese capilar | 1 |
| 1.2 Teoria | 4 |
| 1.3 Modalidades eletroforéticas de análise..... | 11 |
| 1.3.1 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)..... | 11 |
| 1.3.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) | 11 |
| 1.3.3 Eletroforese Capilar em gel (CGE) | 12 |
| 1.3.4 Eletrocromatografia Capilar (CEC)..... | 12 |
| 1.3.5 Isotacoforese Capilar (cITP)..... | 12 |
| 1.3.6 Focalização isoelétrica capilar (cIEF) | 13 |
| 1.4 Detectores em CE..... | 14 |
| 1.4.1 Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C ⁴ D). 17 | |
| 1.5 Análises rápidas por CE | 20 |
| 1.6 Determinação simultânea de cátions e ânions | 21 |
| 1.7 Diclofenaco e seus contra íons | 23 |

| | |
|---|----|
| 1.8 Codeína e Diclofenaco | 26 |
| 2 Objetivos | 29 |
| 3 Parte Experimental | 29 |
| 3.1 Reagentes e amostras | 29 |
| 3.2 Instrumentação | 31 |
| 4 Resultados e discussões..... | 33 |
| 4.1 Metodologia para determinação rápida e simultânea de diclofenaco e seus comuns contra íons em formulações farmacêuticas..... | 33 |
| 4.1.1 Conclusão parcial | 51 |
| 4.2 Metodologia para determinação rápida de diclofenaco de sódio e fosfato de codeína em formulações farmacêuticas | 52 |
| 4.2.1 Conclusão parcial | 65 |
| 5 Conclusões gerais e perspectivas futuras | 66 |
| 6 Referências bibliográficas | 68 |
| 7 Trabalhos desenvolvidos no período..... | 80 |

RESUMO

Neste trabalho são apresentados novos procedimentos analíticos para determinação rápida ($t < 1$ min) de codeína (COD), diclofenaco (DCF) e seus contra-íons sódio (Na), potássio (K), dietilamônio (DEA) e fosfato via eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D). Os métodos propostos podem ser usados no controle de qualidade de matérias primas e de formulações farmacêuticas que possuam tais compostos em sua composição. Dois métodos distintos foram desenvolvidos, um para determinação simultânea e rápida de DCF e seus contra-íons (Na, K e DEA) usando propano 2-Amino-2-hidroximetil-1,3diol / 3 - [[2-Hidroxi-1,1bis (hidroximetil)etil] amino]-1-propanossulfônico (TRIS/TAPS) 10 mmol L⁻¹ (pH 8,2) como eletrólito de corrida (BGE), e outro, para determinação de rápida de DCF, COD e seus contra-íons (Na e fosfato) utilizando trietanolamina/oxalato (TEA/OXA) 10/1,8 mmol L⁻¹ (pH 8,4) como BGE. Ambos os métodos apresentaram baixos desvios padrões relativos em relação à área dos picos e tempos de migração. Na determinação de DCF e seus contra-íons, os valores calculados ficaram entre 2,1-5,7% e 0,69-0,85% e na determinação de DCF e COD entre 0,72-2,7% e 0,23-0,39%, respectivamente. As resoluções calculadas entre os analitos foram as seguintes: 2,06 para Na; 1,99 para DEA; 4,72 para DCF e 7,11 para COD, sendo que todas podem ser consideradas satisfatórias. As curvas de calibração para todas as espécies quantificadas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,992. Os resultados obtidos na análise de formulações farmacêuticas comerciais com os métodos propostos foram comparados aos obtidos por HPLC ou fotometria de chama. A um nível de confiança de 95%, os valores de t calculados (teste t-Student pareado) foram menores do que o valor crítico teórico (2,78, $n = 3$) em todas as análises, o que indica que não há diferenças

significativas entre os resultados encontrados com os métodos propostos e os métodos padrão (HPLC ou fotômetria de chama)

Palavras chave: Diclofenaco, Codeína, Contra íons, eletroforese capilar, detecção condutométrica sem contato, simultânea, rápida.

ABSTRACT

This paper presents new analytical procedures for fast determination (in less than a minute) of codeine (COD), diclofenac (DCF) and its counter-ions sodium, potassium, diethylammonium (DEA) and phosphate by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection (CE-C⁴D). The proposed methods can be used in quality control of raw materials and pharmaceutical formulations which have such compounds in their composition. Two different methods were developed, one for the fast and simultaneous determination DCF and its counter-ions (sodium, potassium and DEA) using TRIS / TAPS 10 mmol L⁻¹ (pH 8.2) as the background electrolyte (BGE), and another for fast determination of DCF, COD and its counter-ions (sodium and phosphate) using TEA / oxalate 10/1,8 mmol L⁻¹ (pH 8.4) as BGE. Both methods had low relative standard deviations of the peak areas and migration times. In the determination of DCF and its counter-ions, the calculated values ranged from 2.1 to 5.7% and from 0.69 to 0.85% and in the determination of DCF and COD between 0.72 to 2.7% and 0.23 to 0.39%, respectively. The calculated resolutions for each analyte were the following: 2.06 for sodium, 1.99 for DEA; 4.72 for DCF, and 7.11 for COD. All resolutions can be considered satisfactory. The calibration curves for all analytes showed correlation coefficients greater than 0.992. The results obtained from the commercial pharmaceutical samples analysis using the proposed methods were compared with those obtained by HPLC or flame photometry. At a confidence level of 95%, the calculated *t* values (paired *t*-Student test) were lower than the theoretical critical value (2.78, *n* = 3) in all analysis, which indicates no significant differences between the results of the proposed methods and the standard methods (HPLC or flame photometry)

Keywords: Diclofenac, Codeine, Counter ions, capillary electrophoresis, C⁴D, simultaneous, fast.

Lista de abreviações

CE – Eletroforese Capilar (do inglês, “*Capillary Electrophoresis*”)

C⁴D – Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (do inglês, “*Contactless Capacitive Coupled Conductivity Detection*”)

BGE – Eletrólito de corrida (do inglês “*Background electrolyte*”)

EOF – Fluxo eletrosmótico (do inglês “*Electroosmotic flow*”)

DEA – Dietilamônio

DCF – Diclofenaco

TRIS – Propano 2-Amino-2-hidroximetil-1,3diol

TAPS – 3 - [[2-Hidroxi-1,1bis (hidroximetil) etil] amino]-1-propanossulfônico

HIS - Histidina

TEA – Trietanolamina

OXA – Oxalato

COD – Codeína

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “*High-performance liquid chromatography*”)

IC – Cromatografia de íons (do inglês *Ion chromatography*)

CZE - Eletroforese capilar de zona (do inglês “*Capillary zone electrophoresis*”)

CTAB- Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês “*Cetyltrimethylammonium bromide*”)

CTAOH - Hidróxido de cetiltrimetilamônio

LOD – Limite de detecção (do inglês “*Limit of detection*”)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês “*Limit of quantification*”)

KDCF – Diclofenaco de Potássio

NaDCF – Diclofenaco de Sódio

DEADCF – Diclofenaco de Dietilamônio

CODDCF – Diclofenaco de Codeína

AINE - Antiinflamatório não-esteróide

IS – Padrão interno (do inglês “*Internal Standard*”)

DPR – Desvio padrão relativo

SNR – Razão sinal/ruído (do inglês “*Signal noise ratio*”)

1- Introdução

1.1 – Breve histórico sobre eletroforese capilar

O fenômeno de movimentação de determinadas espécies, sejam moléculas ou átomos carregados, sob o efeito de um campo elétrico é chamado de eletroforese. Esta técnica é relativamente nova e o responsável por sua introdução foi Arne Tiselius, em 1937[1]. Neste trabalho foi demonstrada a separação de uma mistura de proteínas em tubos contendo soluções tampão sob a ação de um campo elétrico. Esse tipo de separação em solução livre possui limitações na eficiência de separação devido ao aquecimento da solução causado pelo efeito Joule. Desde sua introdução e ainda hoje, a técnica de eletroforese é utilizada na separação de espécies em géis de poliacrilamida ou agarose, com intuito de se separar macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e ribonucleicos). Essas separações são chamadas de eletroforese em placas de gel (do inglês *slab gels electrophoresis*) e são de baixa eficiência e longos tempos de análise. A razão para a baixa eficiência na separação é novamente a variação na temperatura causada pelo efeito Joule.

O efeito Joule é caracterizado pela produção de calor quando uma corrente elétrica atravessa um material condutor. O calor produzido está relacionado ao trabalho realizado no transporte das cargas através do material, num certo intervalo de tempo. Pela ótica microscópica, a causa do aquecimento é a colisão dos elétrons com os átomos do condutor e nesse choque, a energia (momento linear) passa do elétron para o átomo ou molécula do condutor aumentando sua energia cinética (vibração) e por consequência elevando a temperatura. Após 30 anos de sua introdução, Hjertén [2] propôs mudanças na técnica na tentativa de melhorar a eficiência da mesma. Neste

trabalho foi proposto um sistema giratório para minimizar os efeitos de convecção que afetavam os sistemas estacionários, criando assim, a eletroforese em tubos abertos. Tais tubos não eram como os capilares de hoje, pois os diâmetros internos eram da ordem de milímetros. Outra grande contribuição de Hjertén foi num trabalho onde adaptou a eletroforese em gel para tubos capilares mantendo ainda os problemas de eficiência[3].

No início da década de 80 houve uma retomada dos estudos em eletroforese para se desenvolver contornos de uma técnica de separação de alta eficiência, sendo que tais estudos aprimoraram tanto a instrumentação existente quanto a teoria da técnica. Um dos trabalhos que contribuiu muito para tal fato foi publicado por Mikkers *et al.*[4] que descreveu os fenômenos de eletrodispersão em bandas. Porém, o maior avanço nesta área foi realizado por Jorgenson e Lukacs [5, 6], que utilizaram pela primeira vez capilares de sílica fundida com um diâmetro interno de 75 μm , discernindo da até então eletroforese capilar. Com a utilização de capilares com diâmetro interno da ordem de micrometros foi possível minimizar o efeito Joule que tanto afetava a eficiência da eletroforese tradicional. Devido ao pequeno diâmetro interno dos capilares utilizados em CE, temos uma relação favorável entre o volume e a área superficial do capilar, o que favorece a dissipação de calor e permite a aplicação de campos elétricos mais elevados, o que diminui drasticamente os tempos de análise e aumenta a eficiência da separação. Com essa redução do diâmetro interno do capilar, o efeito Joule que tanto prejudicava os estudos iniciais no fim da década de 30 praticamente deixaram de existir. No entanto, tanto a eletroforese em soluções livres de Tiselius, quanto à eletroforese capilar de zona (CZE) partilham do mesmo princípio básico: espécies diferentes e carregadas sob o efeito de um campo elétrico possuem diferentes velocidades de migração.

A partir deste momento, a CE despertou interesse de vários grupos de pesquisa no mundo todo, elevando sua aplicabilidade a níveis jamais vistos. A eletroforese capilar pode ser considerada recente entre as técnicas analíticas e vem sendo aplicada na separação desde íons inorgânicos, como o cloreto e o sódio, até macromoléculas, abraçando, deste modo, praticamente todas as áreas relacionadas às ciências naturais. Um dos vários atrativos desta técnica se dá pelo fato da instrumentação necessária ser relativamente simples, o que levou a muitos grupos idealizarem e construírem seus próprios equipamentos, como é o caso do equipamento usado na realização do presente trabalho. Além disto, outros fatores podem ser citados por atraírem cientistas para a utilização de CE, como:

- Baixo custo: de equipamento a manutenção, por utilizar pequenos volumes de reagentes, principalmente se comparado com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que é outra técnica de separação amplamente utilizada;
- Versatilidade: com apenas um único capilar é possível separar classes de compostos completamente distintas, apenas trocando o eletrólito de corrida;
- E talvez o mais atraente de todos os fatores, tempos de análise em geral bem reduzidos quando comparados com qualquer outra técnica de separação.

No entanto, como qualquer outra técnica a CE possui algumas limitações, como:

- Elevados limites de detecção (LOD): quando acoplada a C^4D , a CE possui LOD na ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol L⁻¹, não sendo capaz de analisar traços, e deste modo há uma escassa variedade de matrizes as quais esta técnica pode ser aplicada.
- Uma dependência extrema com os valores de pH do BGE gera a necessidade de se possuir um tampão estável.

1.2- Teoria

A base da técnica de CE se dá quando uma espécie carregada eletricamente é exposta a um campo elétrico, o que faz com que tal espécie migre com uma velocidade (v_i) proporcional ao campo elétrico aplicado (E), como pode ser visto na Equação 1.

$$v_i = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) E \quad \text{Equação 1}$$

A mobilidade eletroforética μ_{ep} é governada por f (coeficiente de atrito), z (número de cargas elementares do íon) e e (carga elementar) (Equação 2). O coeficiente de atrito é diretamente proporcional ao tamanho do íon e à viscosidade (η) do eletrólito de corrida.

$$\mu_{ep} = \frac{z \times e}{f} \quad \text{Equação 2}$$

Devemos destacar que, o raio que determinará o tamanho do íon é o raio hidratado (solvatado) e, portanto, equilíbrios que envolvem solvatação influenciarão na mobilidade eletroforética das espécies. Então a Equação 2 pode ser reescrita (Equação 2.1).

$$\mu_{ep} = \frac{z \times e}{6\pi r \eta} \quad \text{Equação 2.1}$$

Já a mobilidade eletrosmótica (μ_{eo} , Equação 3) é governada por ε_r que é a permitividade da solução, ε_o que é a permitividade do vácuo, ζ que é o potencial zeta e η que é a viscosidade dinâmica da solução. Com a aplicação de um potencial E teremos a velocidade eletrosmótica v_{eo} (Equação 4).

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_r \times \varepsilon_o \times \zeta}{\eta} \quad \text{Equação 3}$$

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E \quad \text{Equação 4}$$

Por último, mas não menos importante, existe uma mobilidade que está relacionada à presença de carga, chamada mobilidade efetiva. Caso no BGE e no “plug” de amostra existam espécies em equilíbrio, existirá uma parte das moléculas que estarão não ionizadas (com mobilidade eletroforética zero por não possuir carga), e outra fração das moléculas com carga (com um valor específico e particular de mobilidade eletroforética). Assim como a mobilidade iônica descreve a migração dos íons simples, o conceito de mobilidade efetiva descreve a migração de provenientes de ácidos ou bases fracas. Então, a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um analito nada mais é do que a somatória das mobilidades eletroforéticas de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, considerando a distribuição desta espécie. Analogamente à velocidade eletrosmótica, com a aplicação de um potencial E teremos a velocidade eletroforética efetiva v_{ef} da Equação 6.

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \times \mu_j \quad \text{Equação 5}$$

$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \quad \text{Equação 6}$$

Os conceitos de μ_{ef} e v_{ef} são de fundamental importância, porque frequentemente a resolução (separação) entre duas espécies com mobilidades eletroforéticas semelhantes é possível através da modificação dos valores de α pela escolha adequada do pH do BGE ou pela adição de determinado complexante ao mesmo. Assim, espécies podem ser separadas pela manipulação de sua distribuição via pKa ou via constantes de estabilidade do complexo formado.

Outro fenômeno importante relacionado com a migração de espécies em algumas modalidades de CE é o EOF (EOF). Este fenômeno surge a partir da formação de uma dupla camada elétrica entre a solução (BGE) e a coluna usada na separação [7]. Determinados materiais utilizados na fabricação de capilares são hábeis em formar tal

dupla camada elétrica na sua superfície ao serem imersos em certas soluções. Este fenômeno ocorre devido a certas condições do meio que favorecem a adsorção de moléculas ou íons carregados ou principalmente da própria ionização da superfície do material que pode ser de sílica, vidro ou PTFE. Especificamente para a sílica fundida (SiO_2), material mais amplamente utilizado na fabricação dos capilares para CE, a formação da dupla camada elétrica se dá pela presença de vários grupos silanóis (SiOH) residuais na superfície interna do capilar. Esses grupos se comportam como ácidos relativamente fracos ($\text{pK}_a \sim 6$) e, dependendo do pH do eletrólito de corrida, estes grupos poderão estar totalmente protonados ou parcialmente protonados ou ainda totalmente desprotonados. A Figura 1 mostra o efeito do pH sobre a mobilidade o EOF em capilares de diferentes materiais.

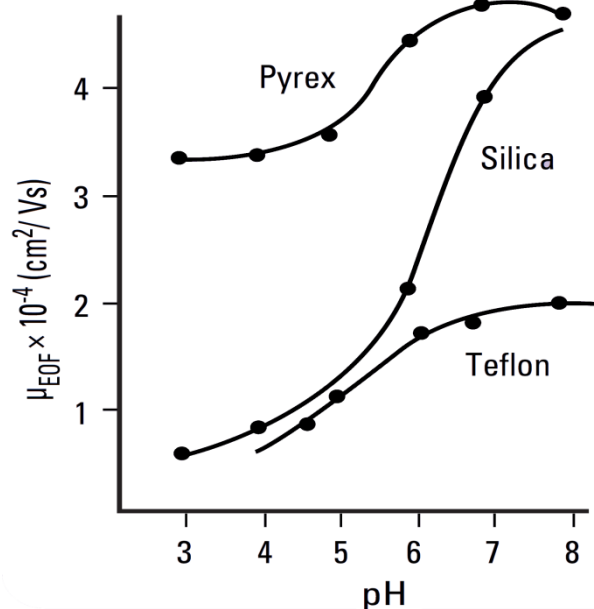


Figura 1 – Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.

Adaptado de [7].

A ionização (desprotonação) dos grupos silanóis (ácido fraco) presentes no capilar de sílica fundida se inicia em pH acima de 3 e é total em pH acima de 8. Espécies do BGE que possuem cargas positivas tenderão a se aderir eletrostaticamente à parede do capilar com intuito de manter a eletroneutralidade do sistema, criando uma primeira dupla camada que é fortemente aderida à parede do capilar, e uma dupla camada difusa (mais distante), com uma interação mais fraca com a parede do capilar. A aplicação de um potencial elétrico longitudinal (aliado ao diâmetro interno do capilar) inicia um processo de migração dos íons do BGE envolvidos na formação da dupla camada elétrica para os pólos de carga oposta. As cargas mais próximas da parede do capilar não migram, porém, as cargas positivas da camada difusa são arrastadas em direção ao cátodo (pólo negativo) e esse fluxo é chamado de EOF normal. Deste modo ocorre uma migração líquida maior de cátions ($\mu_{ef} + \mu_{eof}$) em direção ao cátodo comparada a migração líquida de ânions ($\mu_{ef} - \mu_{eof}$) em direção ao ânodo. Uma analogia pertinente seria considerar o EOF como sendo a correnteza de um rio no qual os cátions nadam a favor da correnteza e os ânions contra esta.

Na análise de ânions é comum inverter a direção do EOF para obter melhor resolução e aumentar a velocidade da análise. No entanto, quando o intuito é a análise de ânions de elevada mobilidade eletroforética, a inversão do EOF é indispensável para que a análise ocorra em tempos aceitáveis ou que seja possível (ânions podem ter velocidade similar ou até serem mais rápidos que o EOF). O método mais utilizado na inversão do EOF emprega a adição de tensoativos catiônicos ao BGE, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês “*cetyltrimethylammonium bromide*”). Quando o capilar sem modificação encontra-se carregado negativamente ($pH > 3$), na adição deste inversor (surfactante catiônico), uma camada fortemente ligada formada por semi-

micelas é adsorvida na superfície interna do capilar carregando a parede interna com cargas positivas. Assim, os ânions do tampão passam a fazer parte da dupla camada elétrica, os quais, sob a ação do campo elétrico se movem em direção ao ânodo (pólo positivo). Assim, temos o EOF invertido (Figura 2).

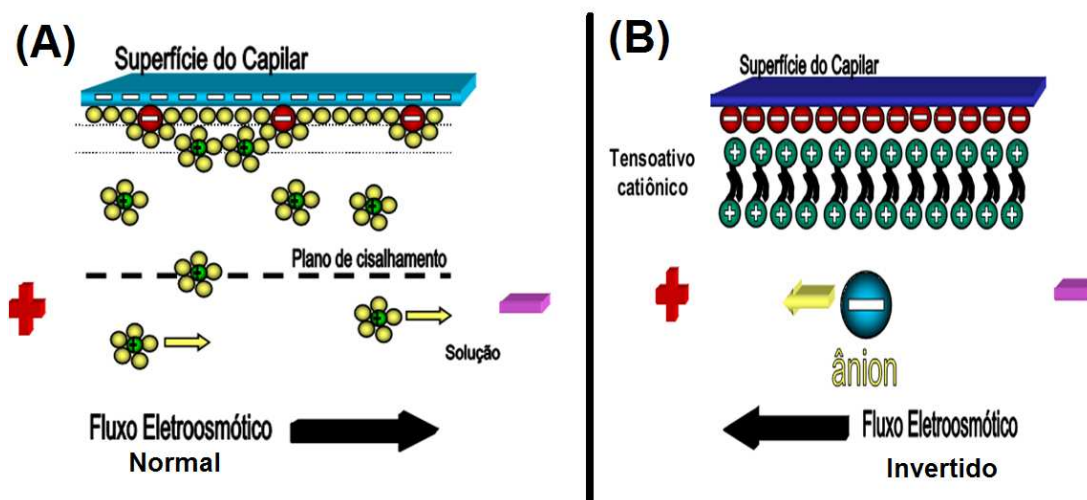


Figura 2 – Composição da superfície interna do capilar com EOF normal (A) e com EOF invertido (B). Adaptado de [8].

O EOF, por se tratar de um fluxo com perfil planar proporciona uma característica positiva quando presente em análises por CE. Nesta condição (com EOF), a análise é livre do efeito de parede presente no fluxo laminar gerado quando se tem fluídos impulsionados sob pressão através de uma tubulação, como análises por HPLC (Figura 3). Essa característica é positiva, pois faz com que os sistemas CE possuam uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo, proporcionando a esta técnica maior eficiência de separação quando comparado a HPLC.

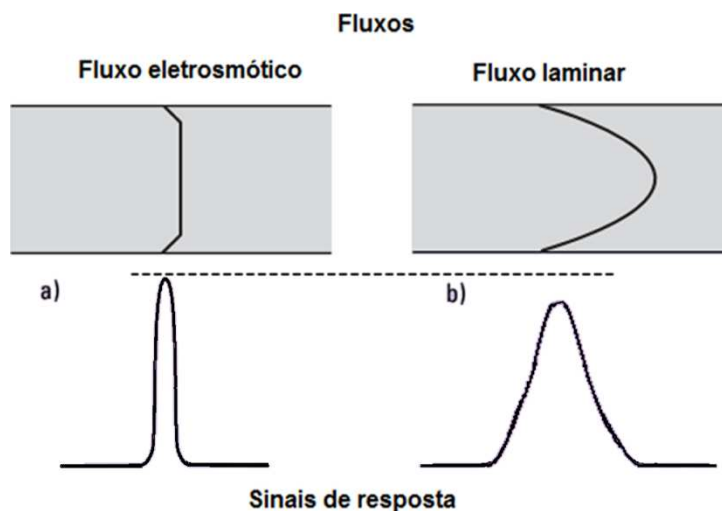


Figura 3 - Perfis dos fluxos eletrosmótico (a) e laminar (b), e suas correspondentes zonas de amostras. Adaptado de [7].

Caso o conjunto usado no sistema CE (tipo de capilar e pH do BGE) apresentem propriedades que possibilitem a presença do EOF, a migração das espécies numa análise de CE não fica atrelada apenas a suas próprias mobilidades, pois a essas será somada ou subtraída a mobilidade do EOF. Deste modo, ao se analisar um eletroferograma, o tempo que as espécies levam para percorrer um determinado comprimento de capilar é determinado pela sua velocidade aparente (v_{ap}), como exposto na Equação 7, a qual corresponde a soma das suas velocidades efetivas (v_{ef}) e da velocidade do EOF (v_{EOF}). Assim como um vetor, o sinal da v_{EOF} é dependente da direção da mesma, adquirindo um sinal positivo caso tenha a mesma direção da v_{ef} , e negativo, caso seja em direção oposta.

$$v_{ap} = v_{ef} \pm v_{EOF} \quad \text{Equação 7}$$

A Tabela 1 apresenta o efeito de algumas variáveis no desempenho de um sistema de CE.

Tabela 1 – Efeito de algumas variáveis no desempenho de um sistema de CE.

| Variável | Efeito |
|--------------------------------|---|
| Campo elétrico | Altera proporcionalmente a v_{EOF} , eficiência, resolução e temperatura. Afeta inversamente o tempo de análise. |
| pH do BGE | Influencia diretamente na ionização da parede interna do capilar, e por sua vez, no potencial zeta (ζ), assim modificando a seletividade do sistema. |
| Força iônica | Afeta inversamente o ζ e o EOF, pois promove a compressão da dupla camada elétrica. Maior efeito Joule devido à presença de correntes mais elevadas para maiores concentrações. |
| Temperatura | A variação de 1 °C promove variação de 2 a 3 % na viscosidade da solução afetando o EOF e a repetibilidade do sistema. |
| Modificadores orgânicos | Alteram a viscosidade e o ζ podendo afetar a seletividade do sistema e geralmente diminuem o EOF. |
| Surfactantes | Adsorvem na superfície do capilar via interações iônicas e/ou hidrofóbicas. Surfactantes aniônicos podem aumentar o EOF, enquanto surfactantes catiônicos podem reduzir ou mesmo inverter o sentido do EOF. |
| Polímeros neutros hidrofílicos | Afeta inversamente o EOF, pois aumenta a viscosidade e recobre a parede do capilar, reduzindo suas cargas. |
| Ligações Covalentes | Modificar quimicamente a parede interna do capilar afeta a estabilidade do sistema e pode até mesmo eliminar o EOF. |

Adaptado de [7].

1.3 – Modalidades eletroforéticas de análise

A eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês “*capillary zone electrophoresis*”) é o modo de separação mais utilizado em CE. No entanto, este modo de separação não permite certas análises ou separações. Em função disto, algumas modificações (variações) foram propostas nas bases da CE a fim de contornar tais limitações. As variações propostas para CZE, tal como cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês “*micellar electrokinetic chromatography*”), eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês “*capillary gel electrophoresis*”), eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês “*capillary electrochromatography*”), isotacoforese (cITP, do inglês “*capillary isotachophoresis*”) e focalização isoeletrica (cIEF, do inglês “*capillary isoelectric focusing*”) apresentam poderes de separação algumas vezes superiores a outras técnicas ou até mesmo exclusivas.

1.3.1 - Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

Entre os modos de separação existentes em CE, a CZE é a mais simplória e a mais amplamente praticada em razão da facilidade de sua implementação e otimização de suas condições experimentais. A técnica baseia-se somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (cátions ou ânions). Geralmente, sua implementação é realizada em eletrólitos aquosos que podem ser misturados a aditivos ou complexantes com intuito de interagir com analitos, alterando suas mobilidades [9].

1.3.2 - Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

Terabe e colaboradores iniciaram os estudos com MEKC em 1984 [10], focando a separação de analitos sem carga com uso de agentes tensoativos iônicos, como o dodecilsulfato de sódio (SDS). O reagente foi usado na formação de micelas no BGE, as quais proporcionam a formação de um sistema cromatográfico de duas fases (o BGE e

as micelas). Assim, o BGE é transportado pela ação do campo elétrico, enquanto as micelas são transportadas pela combinação entre o campo elétrico e a eletrosmose. O que proporciona a separação dos analitos neutros é a partição entre as duas fases (BGE e micelas) [9].

1.3.3 - Eletroforese Capilar em gel (CGE)

Esta técnica é a adaptação da eletroforese em placas de gel para a capilar com a grande vantagem de obtenção de resultados quantitativos mais exatos devido à possibilidade de automação do processo e redução no tempo de análise. É muito utilizada na separação de proteínas, especialmente DNA. Neste modo de separação, uma matriz polimérica (gel) preenche o interior do capilar para que ocorra a separação baseada nos diferentes tamanhos relativo dos analitos [9].

1.3.4 - Eletrocromatografia capilar (CEC)

A CEC nada mais é do que a fusão entre cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a eletroforese capilar (CE). Nesta técnica os capilares são recheados parcialmente com uma fase estacionária, por exemplo, C18, e o transporte da fase móvel não ocorre devido a pressão de uma bomba como em HPLC, mas sim através do EOF empregado em CE [11].

1.3.5 - Isotacoforese capilar (cITP)

Na implementação da isotacoforese é necessário empregar dois tipos de eletrólitos de corrida e os solutos ficam confinados entre as duas regiões compostas por estas soluções. Um dos dois BGEs é chamado de eletrólito líder por apresentar mobilidade eletroforética maior que todos os componentes da amostra, enquanto o outro, eletrólito terminador, apresenta mobilidade eletroforética menor que todos os

componentes do analito. Após a aplicação do campo elétrico temos a migração dos analitos em ordem decrescente de mobilidade, mas com velocidade constante e única. Quando o campo elétrico é aplicado, diferentes gradientes de potencial evoluem cada banda de tal forma que todos os solutos eventualmente migram proporcionalmente com velocidades idênticas. Em regiões onde cátions de menor mobilidade estão presentes, o campo elétrico é mais intenso, do mesmo modo que em regiões de cátions com maior mobilidade o campo elétrico é mais fraco, assim resultando em uma velocidade individual normalizada [9].

1.3.6 - Focalização isoeletrica capilar (cIEF)

A separação de espécies que possuem cargas opostas que podem deixar sua estrutura neutra (anfóteras) pode ser realizada empregando essa técnica, pois ela é capaz de realizar a separação destas espécies quando se tem um gradiente de pH gerado no capilar, de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Ao se atingir o pH no valor do pI da espécie, esta fica neutra e sua migração é interrompida, mas ao entrar em pH diferente do seu pI, a mesma adquire carga e volta a migrar. A protonação e/ou desprotonação destas espécies é responsável pela variação da carga efetiva da molécula em função do pH e, portanto, o gradiente de pH é responsável pela magnitude da mobilidade eletroforética das espécies [9].

1.4 Detectores em CE

O sistema de detecção em CE é de fundamental importância, pois seria pouco eficiente ter uma técnica de separação com elevado desempenho empregando um detector precário que não a complementasse. Talvez o “calcanhar de Aquiles” das técnicas analíticas instrumentais seja a escolha de um detector adequado para realizar a análise. No quadro perfeito, o sistema de detecção que deverá ser escolhido deve ser o mais seletivo possível às espécies de interesse e também o de maior detectabilidade às mesmas. Geralmente um detector é seletivo por analisar espécies com propriedades físico-químicas distintas e é interessante utilizar um destes em análises em que não é possível obter uma separação das espécies. Não há razão para se preocupar com a separação entre a espécie de interesse e outras espécies que não são detectáveis no sistema utilizado. É claro que nenhum detector é perfeito para todas as amostras complexas que existem no universo, portanto, sempre se escolhe o mais adequado a cada situação.

No caso das técnicas de separação, é comum a seletividade do detector ter um papel menos importante do que a detectabilidade, já que quem é responsável pela obtenção de seletividade na análise é a própria separação (quando esta é bem resolvida). A Tabela 2 expõe alguns valores típicos de limites de detecção (LOD) de alguns dos detectores utilizados em CE.

Tabela 2-Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.

| Modo de detecção | LOD / mol L⁻¹ |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Índice de refração (laser) | $10^{-5} - 10^{-6}$ |
| Absorção no UV-visível (direta) | $10^{-5} - 10^{-6}$ |
| Absorção no UV-visível (indireta) | $10^{-4} - 10^{-5}$ |
| Fluorescência direta (lâmpada) | $10^{-7} - 10^{-8}$ |
| Fluorescência direta (laser) | $10^{-9} - 10^{-18}$ |
| Fluorescência indireta | $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| Amperometria | $10^{-8} - 10^{-12}$ |
| Condutividade | $10^{-5} - 10^{-6}$ |
| Raman | $10^{-6} - 10^{-7}$ |
| Radiometria | $10^{-9} - 10^{-11}$ |
| Espectrometria de massas | $10^{-4} - 10^{-9}$ |

Adaptado de [12].

Como previamente mencionado, nenhum método de detecção é perfeito e certas considerações devem ser feitas. Os métodos de detecção fluorimétricos, apesar de serem os mais sensíveis, diversas vezes necessitam de derivatizações dos componentes das amostras antes da análise, o que incide em mais uma etapa de preparo de amostras e possível agregação de erros, sem contar que é um detector de custo elevado para aquisição e manutenção[13]. A detecção sem derivatização também é possível através da adição de uma substância fluorescente ao tampão de corrida (detecção indireta), porém, a sensibilidade neste caso é menor. Já a amperometria é um método com boa sensibilidade e possui, relativamente, boa seletividade. Uma limitação deste detector é a

difficuldade no seu posicionamento (adaptação) no sistema de CE para que não haja interferência do potencial aplicado para gerar o campo elétrico (usado na separação em CE) na corrente detectada no eletrodo de trabalho [14-16].

A espectrometria de massas é outro tipo de detecção que pode ser empregado em CE. Esta técnica agrega uma boa sensibilidade e possui o benefício extra de gerar informações estruturais adicionais, muitas vezes importantes ao se realizar análise de produtos de degradação e metabólitos. Porém, o eletrólito de corrida deve, necessariamente, ser volátil (como o tampão composto por ácido carbônico e amônia) e essencialmente puro para esse tipo de detecção, o que faz com que se tenha limitações em função do pH para trabalhar [17, 18].

O detector mais usado em sistemas CE é absorção por UV-vis [19]. Este detector pode ser usado seletivamente selecionando um comprimento de onda onde os analitos de interesse apresentam absorvidade ou ainda, de forma universal, onde um cromóforo presente no tampão de corrida é constantemente monitorado e analitos que não absorvem podem ser detectados indiretamente. Neste caso uma célula do tipo “Z” muitas vezes é empregada (aumento de sensibilidade) ou faz-se necessário a remoção do revestimento de poliimida do capilar de sílica fundida para que assim seja possível a passagem de radiação [18]. Outra limitação deste detector ocorre quando da tentativa de se analisar espécies não sensíveis aos detectores UV-vis, especialmente para alguns cátions metálicos presentes como co-íons em medicamentos, pois a maioria destes não apresentam absorção na região do espectro UV-Vis e o uso da detecção indireta apresenta limitações em função do pH (precipitação) necessário devido ao uso do cromóforo [20].

1.4.1 – Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C^4D)

Uma alternativa aos detectores condutométricos convencionais (com contato), os quais necessitam adaptações complexas no capilar (perfurações do capilar com laser de CO_2) para posicionar os dois eletrodos que compõem o detector [21], é a utilização de detecção condutométrica sem contato (C^4D , do inglês “*capacitively coupled contactless conductivity detection*”). Trabalhos iniciais com esse tipo de detecção foram realizados por Zemmann e colaboradores [18] e Fracassi da Silva e do Lago [22]. Trata-se de uma alternativa interessante, pois o posicionamento do capilar no detector se tornou mais simples e rápido, pois basta inserir o capilar entre dois cilindros metálicos que são usados como eletrodos neste detector. Além disto, o fato de não haver contato entre os eletrodos do detector e a solução do eletrólito de corrida eliminou o risco de contaminação dos mesmos, assim como diminuiu consideravelmente a interferência do campo elétrico usado na separação das espécies no sistema de CE, obtendo assim, melhor estabilidade e resposta analítica (maior razão sinal/ruído) [23, 24]. Em função disto, a detecção condutométrica sem contato (C^4D) vem ganhando espaço rapidamente como forma de detecção em sistemas de CE [25].

Na detecção por C^4D (eletrodos sem contato com a solução), um sinal senoidal de elevada frequência (na ordem de milhares de Hz) é aplicada, em um dos eletrodos do detector e uma corrente elétrica é detectada no outro eletrodo (apesar de não haver contato entre os mesmos). A corrente elétrica detectada entre os dois eletrodos é proporcional à condutividade da solução que irá fluir no interior do capilar e entre os eletrodos. Essa corrente é convertida em tensão alternada, com posteriores etapas de retificação e amplificação, e através de uma placa conversora analógico-digital gera um registro que pode ser interpretado e trabalhado através de softwares. Um esquema deste funcionamento está representado na Figura 4.

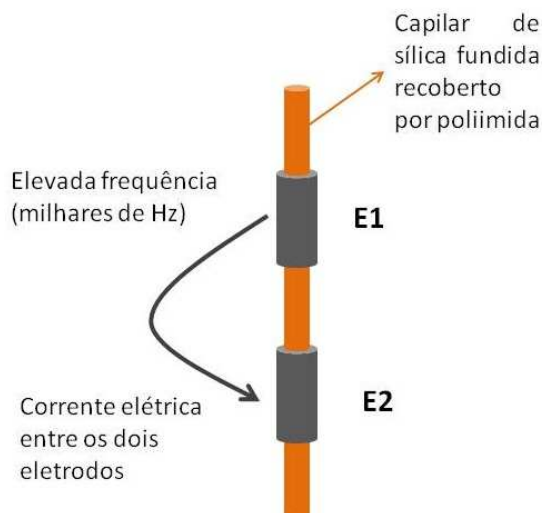


Figura 4 – Esquema do sistema de detecção C⁴D. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.

O funcionamento adequado do detector depende muito do valor da frequência aplicada, pois dependendo do valor, a resistência da solução no interior do capilar deixa de ser detectada e o detector não cumpre o papel de notar variações na condutância. Portanto, uma frequência ótima de trabalho deve ser aplicada, onde a resistência da solução é relevante e pode ser determinada através da corrente que flui entre os eletrodos[21, 23, 24].

O mecanismo da detecção de espécies em C⁴Dé baseado na substituição do co-íon presente no eletrólito de corrida pelo íon a ser analisado. Quando a mobilidade do analito (ex: Na⁺ $\approx 51,9 \text{ cm}^2 / \text{V s}$) for maior que a do co-íon do eletrólito (ex: TRIS $\approx 29,5 \text{ cm}^2 / \text{V s}$) ocorre um aumento da condutividade nessa região do capilar e o detector é sensibilizado, obtendo o registro de um pico positivo no eletroferograma. O contrário também é válido, no caso em que o co-íon do BGE possui maior mobilidade (ex: oxalato $\approx 77,0 \text{ cm}^2 / \text{V s}$) que o íon do analito (ex: codeína $\approx 24,0 \text{ cm}^2 / \text{V s}$), resultando em um pico negativo no eletroferograma. Quanto maior for diferença de

mobilidade do BGE em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector. Portanto deve-se ter atenção na escolha do eletrólito de corrida ao se usar C^4D como detector, pois este possui papel fundamental na sensibilidade de cada analito. Na injeção de soluções aquosas contendo os analitos de interesse, a água, que embora não seja íon, tem uma menor mobilidade do que a mobilidade de qualquer BGE utilizado, então cada eletroferograma normalmente terá um pico negativo. Esse pico negativo, juntamente com outras espécies neutras que co-migraram com a água é o marcador do EOF quando se usa C^4D .

1.5 - Análises rápidas por CE

Entre as características de um método analítico, a frequência analítica é por muitas vezes colocada em segundo plano. Geralmente, a busca por seletividade e sensibilidade se sobrepõe ao tempo de análise e, métodos analíticos que possuem menores limites de detecção e melhor seletividade se destacam, mesmo sendo mais demorados.

Separações com CE podem tornar-se mais rápidas por duas abordagens distintas: usando instrumentos com vários capilares, o qual permite realizar separações de várias amostras simultaneamente [26], ou, como uma alternativa mais barata, utilizando capilares com comprimento reduzido [27]. Ao se aumentar o potencial aplicado ou reduzir o comprimento do capilar e seu diâmetro interno, obtém-se reduções significativas nos tempos de migração das espécies, pois o tempo de migração (t_m) é afetado inversamente pelo potencial aplicado (E) e diretamente pelo comprimento efetivo do capilar (l) e seu comprimento total (L), como pode ser visto na Equação 8 [28].

$$t_m = \frac{lL}{E (\mu_{ep} + \mu_{eo})} \quad \text{Equação 8}$$

O uso de CE acoplado a detectores C^4D em análises com elevadas frequências analíticas é comum. Encontram-se na literatura vários trabalhos com CE- C^4D focados em análises rápidas, como determinação de metais em biodiesel[29]; um medicamento para tratamento de tuberculose e seu produto de degradação[30]; dois grupos de drogas, sendo 8 em uma corrida e 5 em outra [31]; quantificação de benzoato e sorbato em bebidas [32]; propranolol [33] e fosfato de oseltamivir no medicamento Tamiflu® [34]. Em todos estes trabalhos, as análises foram realizadas em menos de 2 minutos.

1.6 – Determinação simultânea de cátions e ânions

Aproximadamente metade de todas as moléculas de fármacos existentes no mercado são formas de compostos iônicos e devem ser analisadas em várias etapas do processo farmacêutico, desde seu desenvolvimento, até o controle de qualidade final [35]. Certas propriedades físicas como solubilidade, higroscopicidade, pH em solução, ponto de fusão, taxa de dissolução, estabilidade química e mecânica, e ainda a forma do cristal, são todas definidas pelo par de íons que forma o composto. Neste caso, a determinação de cátions e ânions é importante devido à possível presença de impurezas que podem ser provenientes da catálise do fármaco ou do processo de fabricação que podem afetar as propriedades supracitadas, gerando efeitos indesejáveis no usuário do medicamento [36]. Recentemente, a determinação simultânea de cátions e ânions em formulações farmacêuticas tem gerado interesse de grandes companhias como a Dionex[®] [36] e a Shimadzu[®] [35] que comercializam equipamentos de cromatografia líquida especificamente para este fim.

Alternativas ao uso dos equipamentos citados acima podem ser localizadas na literatura. Uma destas opções é a determinação simultânea de cátions e ânions via HPLC (cromatografia de íons) utilizando-se simultaneamente colunas específicas para íons positivos e negativos [37] ou colunas de troca catiônica e aniônica [38], o que aumenta o custo do método. O uso de colunas com polímeros de caráter anfótero como fase estacionária também é uma opção [39]. Porém, o uso de cromatografia de íons em análises simultâneas de cátions e ânions requer instrumentação complexa (injetores duplos) e muitas vezes mais do que um tipo de eluente e/ou coluna [40].

A utilização de sistemas de CE-C⁴D (instrumentação mais simples) na determinação simultânea de cátions e ânions contorna alguns obstáculos citados acima, como a necessidade de se dispor de duas colunas e diferentes soluções como fase

móvel. A análise de espécies e seus contra-íons trás uma informação extra sobre a estequiometria dos compostos, além de existir a possibilidade de se detectar outras impurezas e até mesmo processos de degradação do analito [41], o que não é possível em análises singulares. O desenvolvimento de métodos que permitam a separação simultânea de espécies aniônicas e catiônicas em CE é de grande interesse para que se minimize o tempo de trabalho e gasto com soluções.

Algumas estratégias podem ser usadas na separação simultânea de ânions e cátions através de CE. Uma delas foi introduzida por Kubán e Karlberg [42], a qual compreende a injeção dupla da amostra (em ambas as extremidades do capilar) com o detector posicionado próximo ao centro do capilar. Assim, os cátions injetados no pólo positivo (ânodo) migram no sentido normal ao EOF e os ânions injetados no pólo negativo (cátodo) migram em sentido contrário ao EOF [43]. Neste caso é comum trabalhar em condição onde a velocidade do EOF é baixa. Como exemplo podem ser citados a determinação simultânea e estequiométrica de hidrocloreto de labetalol [20] e sulfato de catarantina e ditartarato de vinorelbina [44], além de outros trabalhos com vários íons mais simples como K^+ , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Na^+ , F^- , HPO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- e Li^+ [45, 46]. Outra abordagem é a utilização do sistema de CE regular e um EOF com velocidade de migração elevada, a fim de mover os analitos catiônicos e aniônicos (estes serão arrastados pelo EOF) na mesma direção. Esta estratégia pode ser utilizada com o EOF normal ou com EOF invertido [47]. O modo para tal abordagem é mais simples, pois usa condições em que se tem um elevado EOF (pH elevado), para que ambos cátions e ânions migrem na mesma direção através do detector [48-50]. Esta abordagem normalmente é possível de ser implementada em equipamentos comuns de CE. Outra abordagem, já não tão simplória, é realizar a complexação de espécies catiônicas com um composto quelante, obtendo assim novas espécies carregadas

negativamente, as quais podem ser separadas de modo convencional (EOF invertido) juntamente com analitos aniônicos [51-53].

1.7 - Diclofenaco e seus contra íons.

O diclofenaco (DCF) é um anti-inflamatório não-esteroidal utilizado mundialmente, sendo que também tem propriedades antipiréticas e analgésicas. A molécula possui um pKa próximo de 4 e, portanto, em solução com pH em torno de 3, cerca de 10% de suas moléculas já apresentam carga negativa (em forma de ânion). Com o aumento do pH da solução, a porcentagem de moléculas na forma aniônica (desprotonadas) vai aumentando chegando a 100 % em pH próximo 6, conforme pode ser observado na Figura 5 [54].

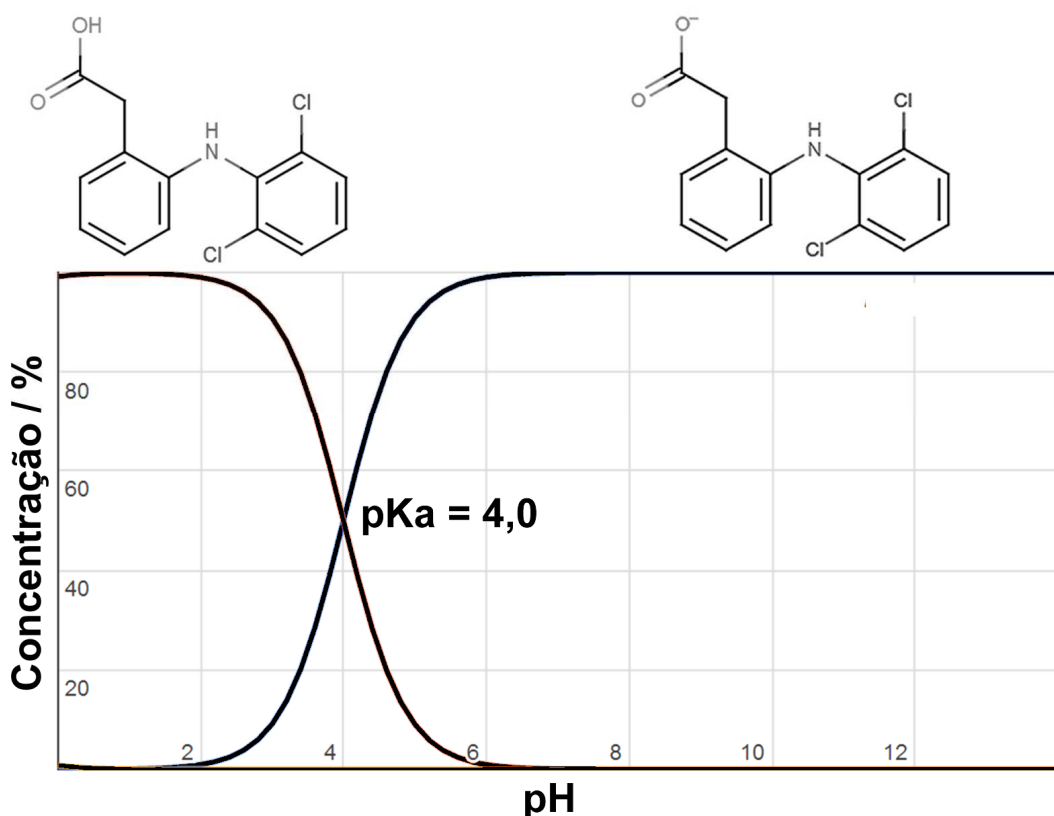


Figura 5 – Distribuição do DCF em solução aquosa em função do pH.

O DCF pode ser encontrado em formulações farmacêuticas na forma de sal com três diferentes contra-íons: sódio, potássio ou dietilamônio. Sais de sódio e de potássio são indicados para administração oral e o sal de dietilamônio para tratamento tópico de processos inflamatórios [55, 56]. Apesar de o diclofenaco de potássio (KDCF) e o diclofenaco de sódio (NaDCF) apresentarem o mesmo ingrediente ativo e serem fármacos de propriedades físico-químicas semelhantes, não são indicados no tratamento dos mesmos sintomas. O KDCF é ligeiramente mais solúvel em água do que NaDCF [57]. Portanto, o KDCF é rapidamente absorvido pelo organismo e tem eficácia analgésica mais rápida do que o NaDCF. Assim, o KDCF é indicado para tratar a dor aguda grave, enquanto o NaDCF é indicado no tratamento de doenças crônicas e prolongadas [58]. Além disso, o consumo excessivo de sódio pode aumentar a pressão sanguínea e afetar a atividade vascular e função renal (retenção de líquidos) [59, 60].

Consequentemente, os indivíduos que têm problemas renais ou cardíacos devem evitar a ingestão elevada de sódio, sendo a estes recomendado o uso de KDCF em vez de NaDCF. Portanto, o controle de qualidade destas formulações farmacêuticas, desde a matéria prima até o produto final, em relação à determinação dos contra-íons é desejável.

Vários métodos têm sido propostos para a determinação de DCF em amostras de medicamentos. Entre as técnicas usadas para este fim, podemos destacar a espectrometria [61-66], cromatografia líquida [66-68], eletroforese capilar [68-70], eletroquímica [71-74], espectroscopia Raman [75], fluorimetria [76, 77] e até mesmo gravimetria [78]. No entanto, todos estes métodos permitem apenas a determinação de DCF sem a obtenção de informações sobre o seu respectivo contra-íon em um único procedimento. Conforme já discutido, a determinação simultânea do princípio ativo e do seu respectivo contra-íon é importante, a fim de se obter informação sobre a composição do sal usado na formulação, o que é por vezes associado a várias propriedades físico-químicas dos fármacos, tais como a solubilidade, estabilidade, os perfis de impureza e polimorfismo [79]. Recentemente, estudos têm sido publicados com o propósito de se realizar a determinação simultânea de cátions e ânions em amostras de medicamentos por cromatografia líquida [39, 79, 80]. Como já mencionado é interesse de empresas como Dionex[®] e Shimadzu[®] na determinação simultânea de ingredientes farmacêuticos ativos, seus respectivos contra-íons e de possíveis impurezas. Nos procedimentos apresentados por essas companhias [35, 36], a determinação simultânea de diclofenaco e sódio é demonstrada, sendo que o procedimento de análise mais rápido proposto apresenta tempo de análise em torno de 4 minutos.

O uso de eletroforese capilar como uma alternativa para a determinação simultânea de princípios ativos e os seus contra-íons em medicamentos é muito atrativo

por ser muitas vezes mais rápido e simples, além de apresentar custo menor do que as outras técnicas citadas anteriormente (HPLC).

1.8 – Codeína e Diclofenaco.

A codeína (COD) é um fármaco utilizado no tratamento de dor moderada, tosse de causa não bacteriana, particularmente tosses prolongadas e dolorosas, como no caso de câncer de pulmão [81]. Esta molécula é encontrada na forma de sal de fosfato e mais raramente como sal de sulfato. É um fármaco alcalóide do grupo dos opióides e, em grande parte é utilizada com finalidades médicas sendo preparada através da metilação da morfina, sendo que pode ser encontrada no ópio em baixas concentrações. Menos potente que a morfina, utiliza-se COD em combinação com outros analgésicos da classe dos não opióides, como ácido acetilsalicílico ou paracetamol ou diclofenaco [82]. O uso deste fármaco pode gerar graves efeitos adversos como diarreia, náuseas, vômitos, obstipação intestinal, secura da boca, prurido, confusão, sedação e depressão respiratória. Além disso, a codeína pode criar vício e ser usada como droga de abuso, embora muito menos frequente do que outros opióides. Após finalizar o tratamento, ao ser retirado abruptamente, a abstinência de codeína pode causar reações relativamente fortes no organismo, como dores abdominais seguidas de vômito e prisão de ventre [83].

A partir de um estudo feito na experimentação com ratos em laboratório [84] foi formulada uma curva de dose-resposta da combinação dos fármacos diclofenaco e codeína. Com o intuito de descobrir se a interação entre estas duas drogas é aditiva, sinérgica ou antagônica, foram estimadas curvas de dose-resposta de cada fármaco administrado individualmente, considerando-se que o efeito observado com a combinação resultava da soma dos efeitos individuais de cada componente [84]. O

estudo demonstra que o efeito antinociceptivo da codeína é bem visto em casos de dor aguda e em hiperalgesia [85, 86]. Por outro lado, o diclofenaco é conhecido por causar antinocicepção após a administração periférica e sistêmica para animais em vários modelos de dor bem como em seres humanos [87]. Sinergismo descreve a interação entre duas drogas tal que, quando administradas concomitantemente, a eficácia ou potência resultante suporta uma interação maior do que aditivo ou multiplicativo quando comparada com cada fármaco administrado individualmente [88, 89]. No estudo supracitado [84], a análise tem demonstrado uma interação significativamente sinérgica entre codeína e diclofenaco. Estes resultados confirmam as experiências anteriores que mostram que a co-administração de opióides e AINEs em ratos produziu um aumento periférico [90], espinhal [87] e sistêmico [91] do efeito antinociceptivo em comparação com as drogas administradas individualmente.

A combinação destes dois fármacos resulta num medicamento utilizado no tratamento de dores causadas por tumores, sobretudo no caso de comprometimento esquelético ou em edemas inflamatórios peritumorais, dores intensas ou muito intensas após intervenções cirúrgicas como extrações dentárias. Por ser um medicamento utilizado em casos extremos, ter poder de droga de abuso e ser de venda restrita, o controle de qualidade das matérias primas empregadas (NaDCF e fosfato de codeína) e das formulações farmacêuticas contendo os dois princípios ativos é desejável.

Assim como o DCF, a COD é uma molécula que apresenta carga em uma extensa região de pH e, portanto pode ser quantificada via eletroforese capilar. Conforme apresentado na Figura 6, a COD possui dois pK_a 's ($pK_{a1} = 9,2$ e $pK_{a2} = 13,8$) enquanto o DCF possui apenas um ($pK_a = 4,0$, Figura 5). Na região de pH entre 5,0 e 9,5, a COD é um cátion e o DCF um ânion. Portanto, nesta região de pH, a determinação simultânea de ambos deve ser possível por CZE.

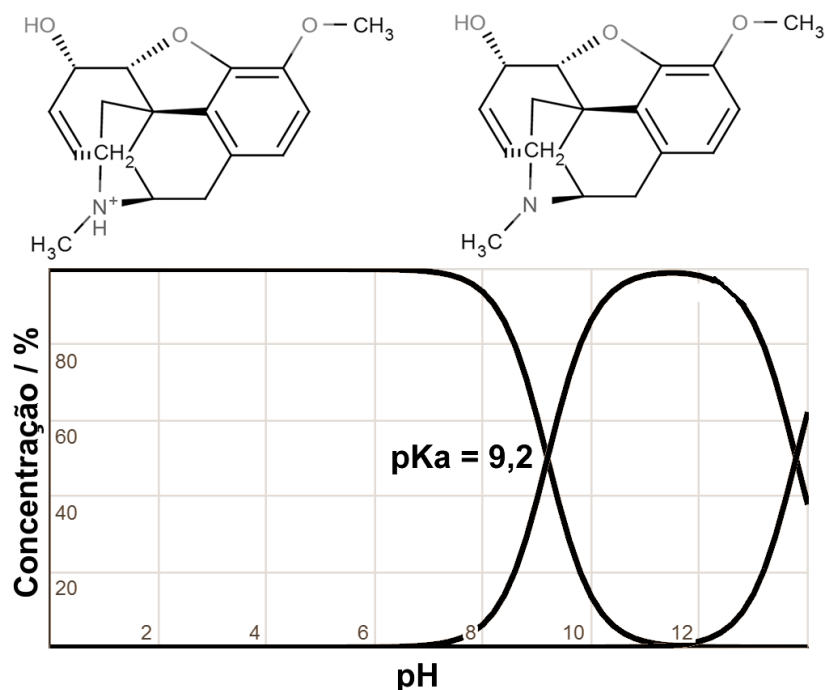


Figura 6 – Distribuição em percentual da concentração em equilíbrio do COD em função do pH.

Na literatura encontram-se apenas alguns métodos para determinação de DCF e COD em amostras farmacêuticas, no entanto, análise simultânea via eletroforese capilar dos dois analitos é encontrada em apenas um trabalho [92]. Neste trabalho, a análise é realizada em 6 minutos usando CZE com detecção por indução eletromagnética. Outro trabalho que determina simultaneamente estes dois fármacos foi realizado por Yang C. Q. *et al.* usando o método de matriz-CPA [93].

Segundo nosso conhecimento, não existe trabalho publicado onde DCF e COD são determinados simultaneamente por HPLC. Provavelmente isto se deve a polaridade destes compostos em função do pH. O DCF apresenta características apolares em soluções com pH inferior a 3,0 (molécula neutra), enquanto que a COD em soluções com pH em torno de 11,0 (molécula neutra), tendo características polares em pH baixo.

A determinação destes compostos também não é simultânea empregando espectrometria de massa, pois um é analisado no modo íons positivos e o outro no modo íons negativos [94].

2 - Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo realizar a determinação rápida de sódio, potássio, dietilamônio, diclofenaco (DCF), codeína (COD) e fosfato presentes em formulações farmacêuticas. Adicionalmente também propomos o uso dos métodos propostos na determinação da pureza e grau de degradação dos princípios ativos estudados. Neste trabalho são propostos dois métodos simples e rápidos de análise usando a técnica de CE-C⁴D: (i) determinação simultânea de DCF e seus contra-íons comuns: sódio, potássio e dietilamônio; (ii) determinação simultânea de diclofenaco de sódio e fosfato de codeína.

3 -Parte experimental

3.1- Reagentes e amostras

Todos os reagentes foram de grau analítico sendo utilizados sem purificação prévia. Diclofenaco de sódio, de potássio, de dietilamônio e fosfato de codeína foram adquiridos da empresa Galena. Hidróxido de lítio, histidina, ácido láctico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), propano 2-Amino-2-hidroximetil-1,3diol (TRIS), e 3 - [[2-Hidroxi-1,1bis (hidroximetil) etil] amino]-1-propanossulfônico (TAPS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Hidróxido de sódio, cloreto de sódio, trietanolamina (TEA) e ácido oxálico foram adquiridos da Synth. Cloreto de potássio, cloreto de cálcio

e cloreto de magnésio foram comprados da Vetec. Água desionizada (18 MQ cm^{-1}) foi obtida a partir de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). Acetonitrila para uso na validação por HPLC foi adquirido da Merck. Uma solução tampão (pH 8,2) contendo 10 mmol L^{-1} TRIS e de 10 mmol L^{-1} de TAPS foi usada como eletrólito de corrida (BGE) na determinação de DCF e seus contra-íons. Outro eletrólito de corrida que foi utilizado na determinação simultânea de codeína e diclofenaco é composto por TEA/ácido oxálico ($10/1,8 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente). Alguns testes foram realizados com tampão formado por concentração equimolar (20 mmol L^{-1}) de ácido láctico/histidina (LAC/HIS). Todas as soluções amostra e padrão foram preparadas diariamente em água desionizada e foram mantidos sob ultra-som durante 10 min para completa solubilização.

Antes da injeção no sistema CE- C^4D , todas as soluções resultantes foram filtradas com um filtro de membrana (tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$). As amostras de formulações farmacêuticas foram adquiridas em farmácias locais em forma de comprimidos (drágeas) de KDCF e de NaDCF e na forma de spray quando se tratava de diclofenaco de dietilamônio (DEADCF). No procedimento de preparo das amostras, dez comprimidos foram pesados de cada amostra e em seguida macerados a um pó fino e homogêneo. Posteriormente, uma massa adequada do pó foi devidamente pesada e dissolvida em água até uma concentração situada na faixa linear do método proposto. No preparo da amostra de DEADCF (tipo spray), uma alíquota foi pesada e diretamente diluída em água. Como inversor de fluxo para análise de ânions, foi usado o hidróxi-hexadecil-trimetil-amônio (CTAOH). Este composto foi preparado a partir de brometo de hexadecil-trimetil-amônio (CTAB), cujo brometo foi substituído por hidroxilas em uma coluna de troca aniônica (Merck).

3.2 - Instrumentação

Todos os eletroferogramas foram obtidos utilizando um equipamento de CE construído no laboratório do Prof. Caludimir Lúcio do Lago, no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP. O equipamento é equipado com dois detectores condutométricos sem contato compactos e de alta resolução acoplados capacitivamente (CE- C^4D) [22, 95].

Nos trabalhos realizados neste mestrado, o equipamento de CE usado possui dois destes detectores como pode ser visualizado na Fig. 7 (a) e também a estratégia utilizada nos trabalhos na Fig. 7 (b).

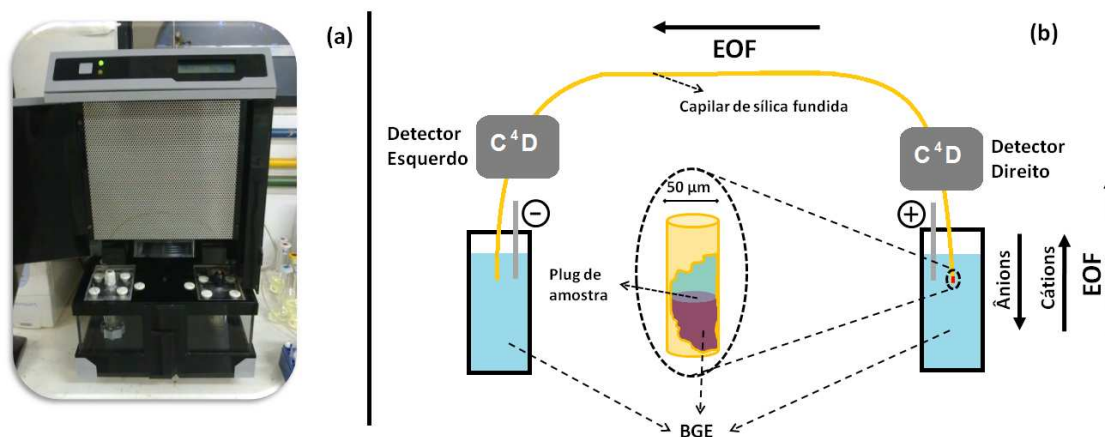


Figura 7 – (a) Imagem do equipamento usado no laboratório; (b) Esquema do sistema e modo de injeção usado nesse trabalho.

Esta versão utilizada de C^4D não possui partes móveis, como potenciômetros e conectores, sendo assim um detector compacto e robusto. Um oscilador trabalhando na frequência de 1,1 MHz foi otimizado para uso de capilares com diâmetro interno no intervalo de 20 até 100 μm . O sinal do oscilador é do tipo senoidal e sua amplitude é de 4 Vpp [95].

As injeções eram realizadas no lado direito do equipamento. Os detectores estão posicionados ao longo do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida utilizado em todos os experimentos tinha 40 cm de comprimento, 50 μm de diâmetro interno e de 375 μm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA, EUA). Desta forma, no primeiro detector, o comprimento efetivo do capilar era de 10 cm e no segundo, de 30 cm. Antes da utilização, os capilares foram pré-condicionados por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos, em seguida com água desionizada durante 10 minutos e, finalmente, com BGE a ser utilizado nos experimentos durante 10 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 1,5s e 25 kPa. Todos os ensaios foram realizados com a aplicação de uma diferença de potencial de 25 kV.

O sistema HPLC utilizado nos testes de validação consiste numa bomba Hitachi L21-30, detector UV-vis LC-4250 Hitachi e uma coluna Shim-pack CLC-ODS (25 mm x 4,6mm; Shimadzu). A fase móvel para determinação de DCF foi adaptada de [73] e era composta por acetonitrila e água desionizada com pH corrigido para 2,5 com ácido fosfórico (60:40 v/v). Comprimento de onda de 280 nm e vazão de 1,5 mL min⁻¹. Para os testes com COD, a fase móvel foi adaptada de [96] e consistiu em metanol, tampão acetato pH 4,7 e acetonitrila (85:5:10, v/v). A vazão usada foi de 1,5 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 254 nm. Nos estudos de validação dos resultados obtidos para Na e K foi utilizado um fotômetro de chama modelo Analyser 910M.

4 - Resultados e discussões

4.1 - Metodologia para determinação rápida e simultânea de diclofenaco e seus contra íons comuns em formulações farmacêuticas.

Normalmente, as análises por CE são realizadas com as espécies de interesse se movimentando (migrando) no interior do capilar na mesma direção do EOF com o intuito de aumentar a velocidade da análise (mobilidade eletroforética + mobilidade eletrosmótica). Em um capilar de sílica fundida sem modificação, o EOF se movimenta na mesma direção dos cátions. Devido ao caráter aniônico do DCF (objetivo inicial) em soluções aquosas com pH superior a pH 3 ($pK_a = 4,0$), uma prática comum na determinação de DCF por CE seria a inversão do EOF, o que muitas vezes é feito através da adição de um agente tensoativo catiônico ao BGE (análise de ânions no modo co-EOF). Com intuito de verificar rapidamente as melhores condições para a determinação de DCF por CE- C^4D , o software de simulação denominado Peakmaster[®] (versão 5.2) disponibilizado gratuitamente na internet [97] foi usado em estudos iniciais. No entanto, as condições simuladas com a inversão do EOF não foram confirmadas na prática, provavelmente devido à interação do analito aniônico (DCF) com um monômero do hidróxido de cetiltrimetilamônio (CTAOH) ou com suas micelas [98], o qual foi utilizado para reverter o EOF. Estes estudos foram realizados com diferentes BGE's contendo CTAOH $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ como inversor de EOF, e resultados semelhantes foram obtidos em todos os estudos. Por este motivo, o agente tensoativo catiônico deixou de ser usado e o EOF no modo normal foi usado nos estudos que se seguem. Conforme o eletroferograma obtido por simulação[97], o BGE contendo concentração equimolar de TRIS e TAPS (pH 8,2) permite a determinação rápida de

DCF (em cerca de 40 s) utilizando o primeiro detector do equipamento CE-C⁴D (comprimento efetivo do capilar = 10 cm).

A Figura 8 apresenta os eletroferogramas obtidos com o sistema CE-C⁴D nas condições simuladas no Peakmaster[®] em função da concentração do BGE composto por TRIS e TAPS.

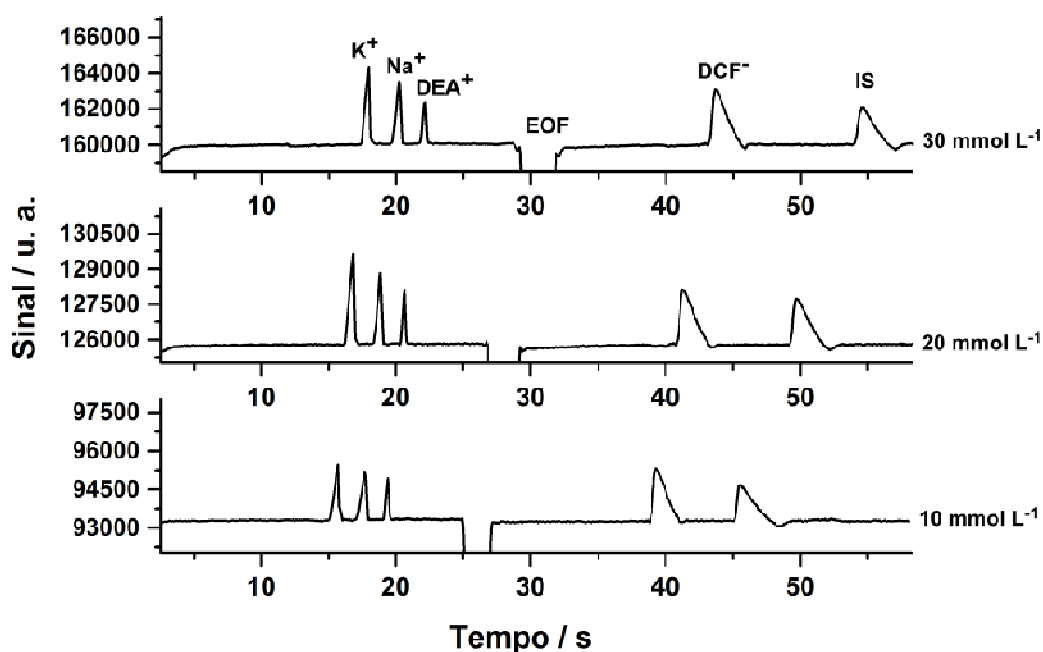


Figura 8 – Eletroferogramas obtidos pelo estudo de diferentes concentrações do BGE de TRIS / TAPS pH 8,2 injetando uma solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada). Demais condições: (IS) Salicilato 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$; comprimento efetivo do capilar: 10 cm; diferença de potencial aplicada: 25 kV; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,5 s; diâmetro interno do capilar: 50 μm .

Neste estudo, a amostra foi injetada no lado do ânodo e o ânion DCF, apesar de ser atraído para o ânodo (potencial positivo) devido sua mobilidade eletroforética, acaba se deslocando (migrando) em direção ao cátodo (potencial negativo) acompanhando a direção do EOF que, nesta condição (pH = 8,2), apresenta velocidade muito superior a

do DCF e na direção oposta. Nesta condição, o pico do DCF foi detectado imediatamente após o EOF (queda do sinal devido à baixa condutividade da água) com uma resolução aceitável em todos os BGEs. No entanto, na concentração de TRIS/TAPS 10 mmol L^{-1} , a velocidade da análise é ligeiramente maior e, portanto, esta concentração foi adotada nos estudos posteriores. Essa maior velocidade devido a menor concentração do BGE está relacionada à menor quantidade de cátions que formam a dupla camada elétrica com a parede do capilar, deste modo, o potencial aplicado precisa mover menos espécies que estão sendo atraídas eletrostaticamente aos grupos silanóis do capilar. Concentrações inferiores não foram testadas devido à diminuição da capacidade tamponante com a concentração. Nesta condição, além da possibilidade de determinação rápida de DCF, os contra-íons comuns do DCF em formulações farmacêuticas (K^+ , Na^+ e DEA^+) podem ser detectados antes do EOF e assim, além da quantificação, uma caracterização estequiométrica do princípio ativo também é possível em cada análise [43]. A Figura 9 apresenta um eletroferograma típico de uma (a) solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada). Adicionalmente, eletroferogramas de três soluções preparadas a partir de três amostras farmacêuticas comerciais também são apresentados: (b) DEADCF, (c) KDCF e (d) NaDCF. Em todas as soluções, salicilato $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi adicionado como padrão interno (IS). O ânion cloreto proveniente dos padrões de KCl e NaCl não foi detectado devido à sua elevada mobilidade eletroforética, o que impede a sua migração na mesma direção do EOF em direção ao detector.

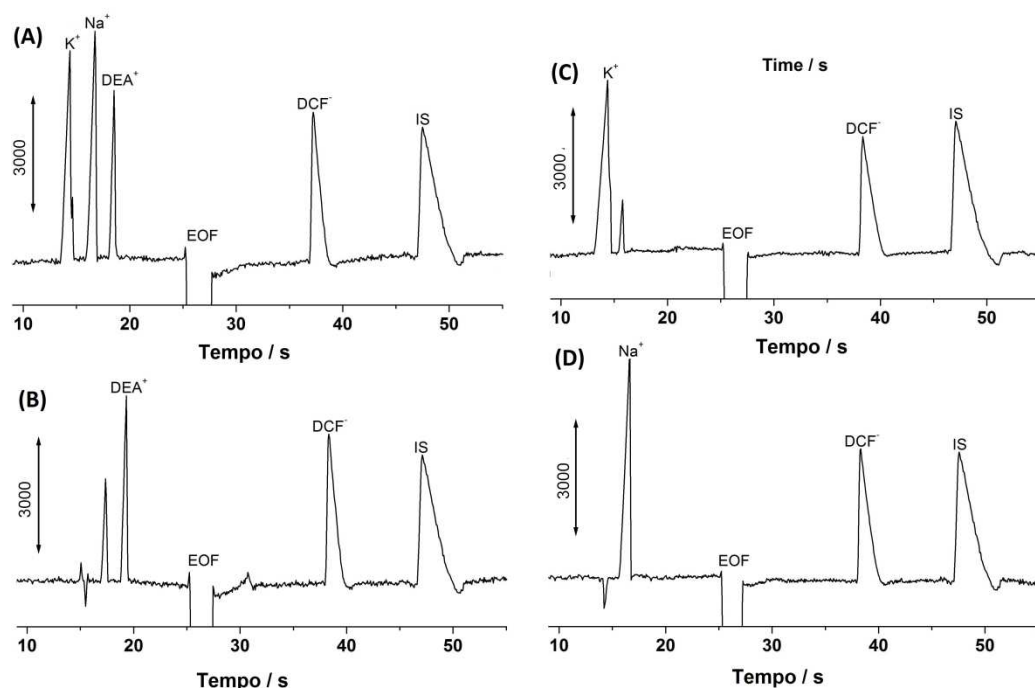


Figura 9 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de: (a) solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada) e soluções preparadas de amostras comerciais de (b) DEADCF, (c) KDCF e (d) NaDCF. Demais condições: (IS) Salicilato $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, comprimento efetivo do capilar: 10 cm; diferença de potencial aplicada: 25 kV; Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1.5 s; diâmetro interno do capilar = $50 \mu\text{m}$; BGE: Tris/TAPS 10 mmol L^{-1} pH 8,2.

A composição equimolar de TAPS/TRIS 10 mmol L^{-1} fornece ao sistema CE- C^4D uma linha base estável devido a sua baixa condutividade [97] e uma separação muito rápida (em cerca de 50 s) de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- , incluindo salicilato como IS. Devido a uma pequena diferença no tempo migração para DEA na amostra e solução padrão, um estudo de adição de padrão foi realizado com esta amostra para confirmar o sinal desta espécie. Tal variação no tempo de migração pode estar relacionada com algum excipiente presente na amostra, no entanto, esta pequena mudança no tempo de migração não afetou o resultado final da análise. Estes resultados também demonstram

que o método proposto possibilita o controle de qualidade das três formulações farmacêuticas contendo DCF existentes no mercado, pois sobreposições ou picos adicionais provenientes de interferentes não foram detectados. No entanto, nos eletroferogramas das amostras de (b) DEADCF e (c) KDCF, outro pico foi detectado, o que poderia ser atribuído à contaminação da amostra com Na^+ ou de contra-íons provenientes dos sais de estearato ou carbonato (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), que são normalmente adicionados nestas amostras como excipientes inativos, conforme consta na bula dos medicamentos. Na condição experimental utilizada, tanto Ca^{2+} quanto Mg^{2+} apresentaram tempo de migração similar a do Na^+ .

Essa dúvida foi resolvida com a análise dessas amostras por CE- C^4D utilizando uma mistura equimolar de ácido láctico/histidina (20 mmol L^{-1} , pH 4,9) como o BGE. Nestas condições, o Ca^{2+} e Mg^{2+} formam complexos com o ácido láctico durante a análise e uma separação satisfatória entre os picos relacionados com Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} [44, 45] pode ser obtida. Na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos usando ácido láctico/HIS como BGE mediante injeção de soluções amostra contendo (a) DEADCF, (b) NaDCF, (c) KDCF e de uma (d) solução padrão contendo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e DEA^+ .

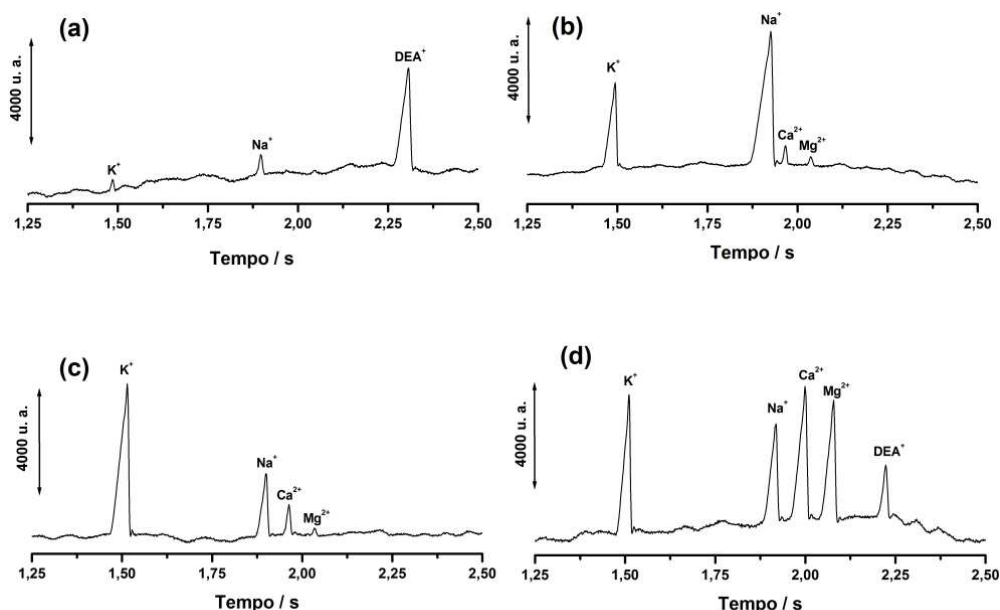


Figura 10– Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções amostra de (a) DEADCF, (b) NaDCF, (c) KDCF e (d) solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF, CaCl_2 e MgSO_4 ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada). BGE: His/Lac 20 mmol L^{-1} pH4,9. Potencial aplicado: 20 kV. Demais condições: idem Fig. 9.

Com os resultados apresentados na Figura 10 é possível concluir o seguinte:

- I. Nestas condições (Fig. 10 d) existe uma boa resolução entre os cátions de interesse (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e DEA^+);
- II. Em todas as amostras de NaDCF analisadas, a área de pico de Na^+ foi 17 vezes maior do que a área somada dos picos de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Assim, podemos concluir que a presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} nestas amostras é muito pequena e a caracterização estequiométrica de NaDCF é possível nestas amostras em menos de 1 minuto usando TRIS/TAPS como BGE.
- III. Nas amostras de DEADCF e KDCF, picos relacionados com sódio estão presentes, o que confirma que os picos adicionais presentes na Figura 9 (TRIS/TAPS como

BGE) podem ser atribuídos à contaminação com sódio ou ao uso de NaDCF em substituição a DEADCF e KDCF.

IV. Nestas condições, DCF não é possível de ser detectado (EOF de baixa mobilidade).

Nos estudos de otimização do método proposto, a influência de parâmetros como potencial de separação e tempo de injeção (hidrodinâmica a pressão constante) foram estudados. Nas figuras 11 e 12 são apresentados os resultados obtidos em função da variação na diferença de potencial aplicada e tempo de injeção, respectivamente.

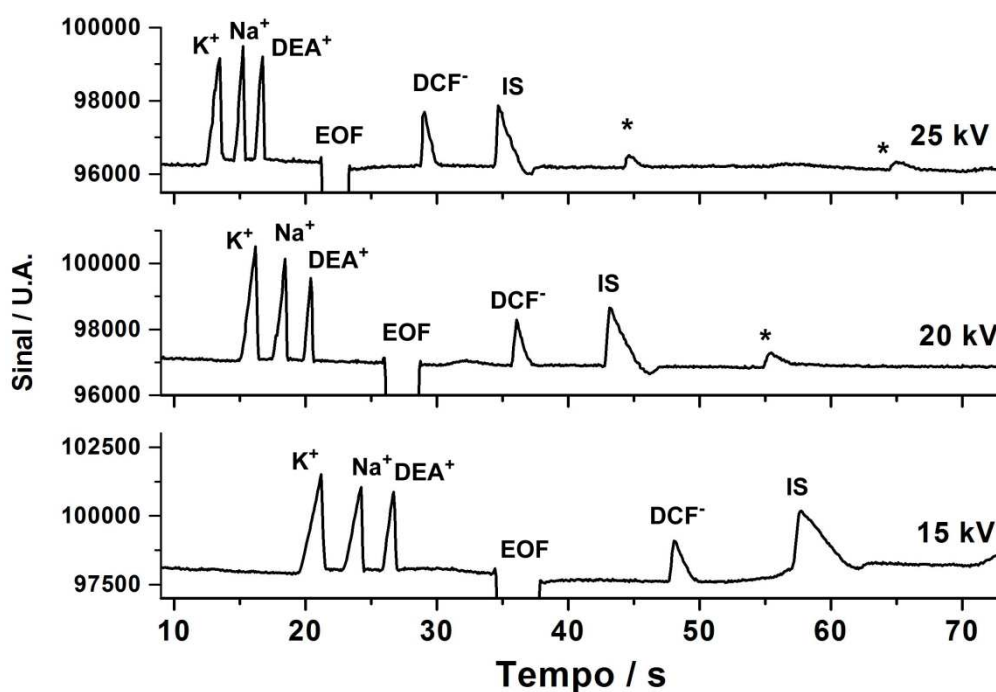


Figura 11 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF(300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada;) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25kV). (*) picos de sistema ou de espécie não identificada; demais condições: idem Fig. 9.

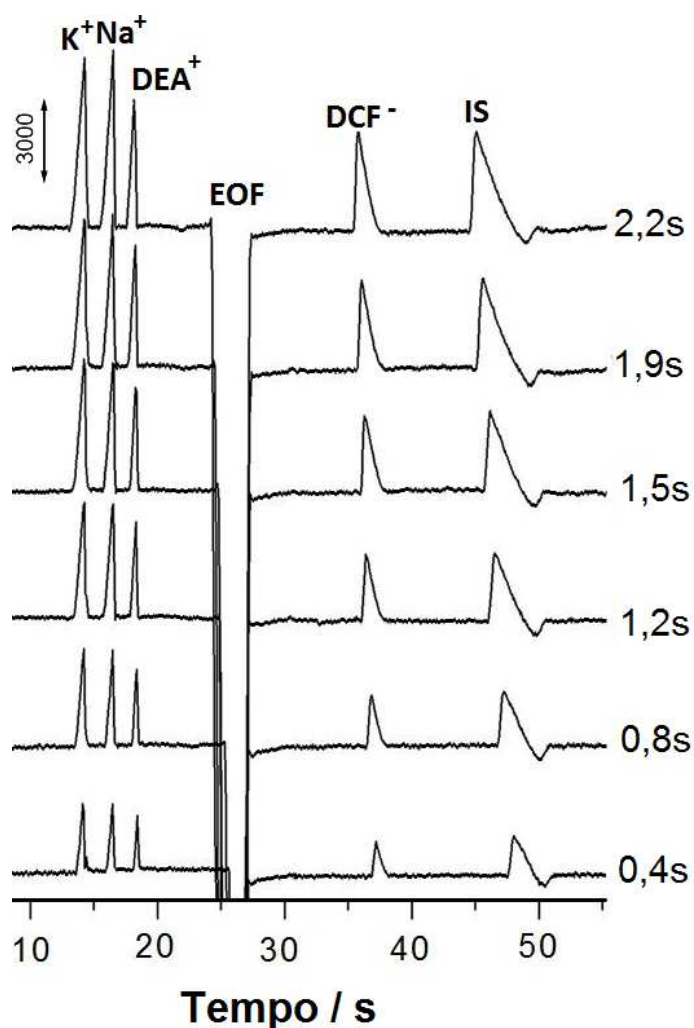


Figura 12 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada). Pressão constante de injeção: 25 kPa; demais condições experimentais: idem Fig. 9.

Conforme apresentado na Fig. 11, quanto maior o potencial aplicado, maior é a velocidade de análise. Portanto, como um dos objetivos do estudo é a determinação rápida, o potencial de 25 kV foi adotado nos estudos seguintes. A fonte de alta tensão do equipamento permite a aplicação de até 30 kV, porém, neste potencial, era comum ocorrer fuga de alta tensão e as análises se tornavam pouco reprodutíveis e com linha bases ruidosas. Quanto ao tempo de injeção (Fig. 12), é possível observar uma melhora na sensibilidade com o aumento no tempo de injeção (aumento no volume injetado). A

opção ocorreu por um tempo intermediário (1,5 s; 25 kPa). No entanto, em todos os casos, a determinação seria possível.

Após a otimização destes parâmetros procedeu-se com o estudo de repetibilidade para checar a estabilidade do sistema. O desempenho do sistema com os parâmetros otimizados é mostrado na Figura 13 com a sobreposição de 10 eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada) e salicilato como IS (150 mmol L^{-1}). Os resultados estatísticos calculados a partir dos dados desta figura estão apresentados na Tabela 3.

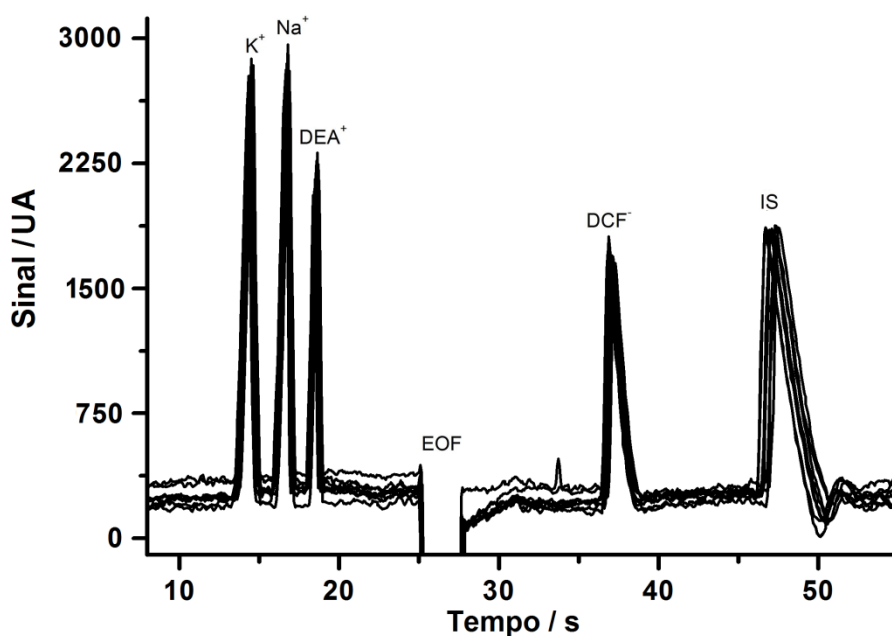


Figura 13- Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo KCl, NaCl e DEADCF ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) e salicilato $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ como IS. Demais condições vide Fig. 9.

Tabela 3 - Características analíticas do método proposto.

| Analito | Tempo de migração ^a | Área do pico ^a | LOD ^b | LOQ ^c | R ^d |
|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|
| | (s) | | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | |
| K ⁺ | 14,4 \pm 0,1 | 22,6 \pm 1,1 | 7,1 | 23,7 | - |
| Na ⁺ | 16,7 \pm 0,1 | 24,5 \pm 1,0 | 5,6 | 18,7 | 2,06 \pm 0,24 |
| DEA ⁺ | 18,4 \pm 0,1 | 12,3 \pm 0,7 | 7,1 | 23,6 | 1,99 \pm 0,12 |
| DCF ⁻ | 36,9 \pm 0,3 | 21,6 \pm 0,9 | 10,4 | 34,6 | 4,72 \pm 0,24 |
| IS | 46,9 \pm 0,4 | 43,7 \pm 0,9 | - | - | 3,53 \pm 0,21 |

^a(n = 10); ^bpara SNR = 3; ^cpara SNR = 10; ^dResolução entre o pico do analito correspondente e o pico anterior.

Os resultados obtidos no estudo de repetibilidade demonstram que o método proposto apresenta boa estabilidade com desvios padrões relativos inferiores a 5 e 0,7 % em relação à área e tempo de migração, respectivamente. Os LODs obtidos pela técnica são suficientes para quantificação de matérias primas e também realizar o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos acabados. A resolução entre os picos também pode ser considerada muito boa, uma vez que em CE, valores de resolução superiores a 0,75 já são consideradas como uma separação adequada para quantificação. Este resultado também indica que as determinações propostas poderiam ser realizadas com maior rapidez (uso de capilar menor). Esta hipótese não foi testada devido a limitações impostas pelo equipamento.

Após a realização destes estudos de otimização do método, um teste de linearidade foi realizado com as espécies a serem estudadas, o qual é apresentado na Figura 14.

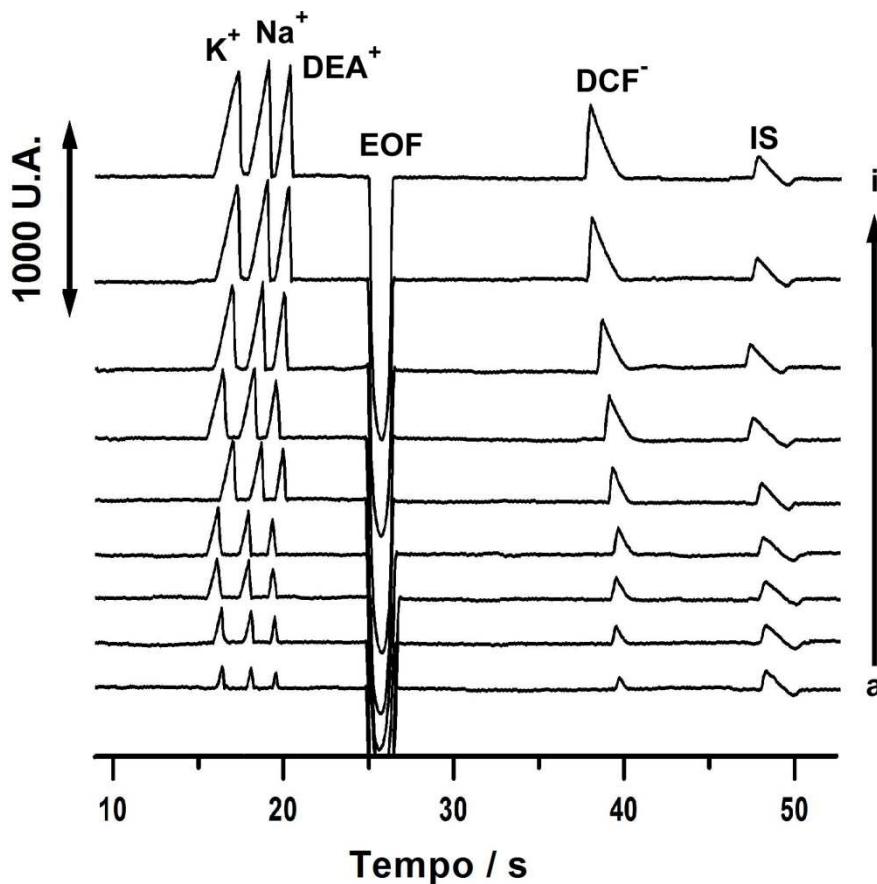


Figura 14 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- (a:100; b:200; c:300; d:400; e:500; f:700; g:900; h:1200 e i:1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com coeficientes de correlação de 0,992; 0,991; 0,989 e 0,984; respectivamente. Demais condições vide Figura 9.

Como pode ser visualizado na Figura 14, até mesmo em elevadas concentrações se tem resolução e relação linear entre concentração e sinal do detector para todos os analitos. Uma faixa menos ampla de concentração foi escolhida para se construir uma curva analítica. A Figura 15 apresenta os eletroferogramas obtidos a partir da injeção de

soluções padrão contendo concentrações crescentes de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- (100 - 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as suas respectivas curvas de calibração.

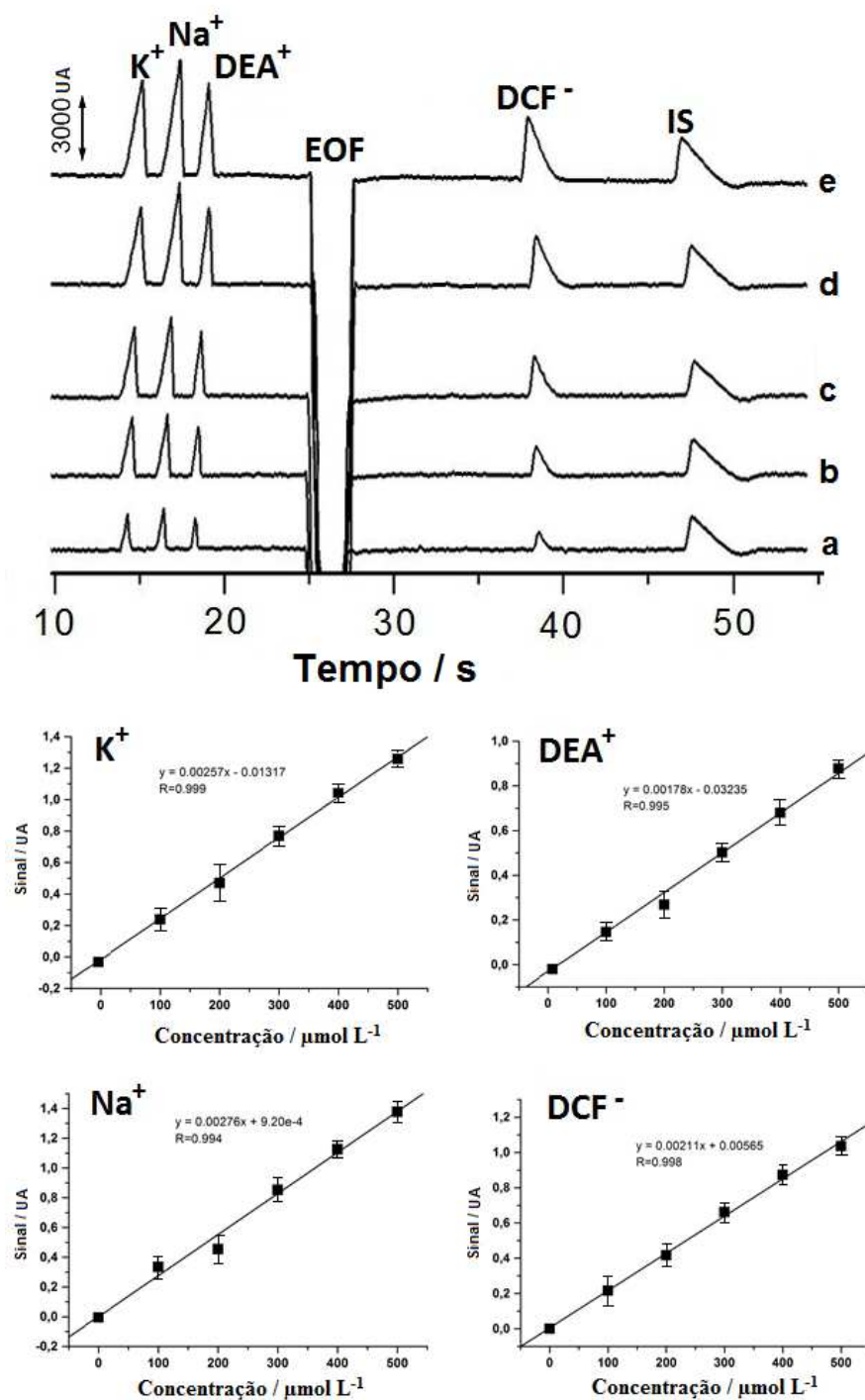


Figura 15 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- (100 - 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as suas respectivas curvas de calibração. Demais condições vide Figura 9.

As curvas de calibração apresentaram boa linearidade para todos os analitos no intervalo de concentração entre 100 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (todos os coeficientes de correlação são superiores a 0,994). Os limites de detecção do método foram calculados a partir deste gráfico e são apresentados na Tabela 3. O limite inferior do intervalo de calibração foi estabelecido de acordo com a detectabilidade do DCF (não detectado em concentrações mais baixas) e o limite superior de acordo com a resolução entre os respectivos cátions. A utilização do mesmo intervalo linear de concentração para todos os compostos é útil quando o objetivo é, além da quantificação, a caracterização estequiométrica do sal.

As curvas de calibração apresentadas na Fig. 15 foram usadas para avaliar a precisão do método CE- C^4D proposto mediante estudos de adição e recuperação e comparação dos resultados obtidos com o método proposto aos obtidos por HPLC (DCF) e por fotometria de chama (Na^+ e K^+). Os estudos de adição e recuperação apresentaram excelentes resultados com recuperações entre 98 e 106% para todos os analitos. A Tabela 4 apresenta uma comparação dos resultados obtidos com o método proposto e os obtidos por HPLC (DCF) e fotometria de chama (Na^+ e K^+) na análise de três amostras farmacêuticas (KDCF, NaDCF e DEADCF).

Tabela 4 – Comparação dos resultados^a obtidos na determinação simultânea de Na⁺, K⁺, DEA⁺ e DCF⁻ via CE-C⁴D versus HPLC (DCF) ou Fotometria de Chama (Na⁺, K⁺).

| Amostras | Íons | Bula ^a | HPLC ^a | Fotometria de Chama ^a | CE-C ⁴ D ^a | E1 (%) | E2 (%) |
|----------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------|-----------|
| 1 | Na ⁺ | 3,61 | - | 3,55 ± 0,03 | 3,56 ± 0,05 | -1,4 | +0,3 |
| 1 | DCF ⁻ | 46,39 | 44,9 ± 0,6 | - | 44,3 ± 0,8 | -4,5 | -1,3 |
| 2 | K ⁺ | 5,84 | - | 4,69 ± 0,03 | 4,65 ± 0,06 | -20,4 | -0,9 |
| 2 | DCF ⁻ | 44,16 | 43,4 ± 0,6 | - | 42,1 ± 0,8 | -4,7 | -3,0 |
| 2 ^d | Na ⁺ | - | | 1,12 ± 0,04 | 1,10 ± 0,03 | | -1,8 |
| 3 | DEA ⁺ | 2,33 | | - | 2,01 ± 0,01 | -13,7 | - |
| 3 | DCF ⁻ | 9,27 | 8,72 ± 0,12 | - | 8,95 ± 0,14 | -3,5 | +2,6 |
| 3 ^d | Na ⁺ | - | | 1,25 ± 0,03 | 1,28 ± 0,04 | | +2,3 |

^a Resultados em mg/comprimido (amostras 1e 2); mg/g (amostra 3) e são apresentados como a média de 3 medidas e seu respectivo desvio padrão; ^{E1}Diferença entre CE-C⁴D proposto e o valor que consta na bula; ^{E2}Diferença entre CE-C⁴D proposto e o método de referência; ^dPresença de sódio nas amostras de KDCF e DEADCF.

Todos os resultados obtidos pelo método proposto de CE-C⁴D são similares aos obtidos por HPLC (DCF) ou fotometria de chama (Na⁺ e K⁺). A um nível de confiança de 95%, os valores de *t* calculados (teste *t-Student* pareado) foram menores do que o valor crítico teórico (2,78, n = 3), o que indica que não há diferenças significativas entre os resultados. O resultado obtido para a determinação de DEA não foi comparado com outro método de análise, no entanto, os resultados obtidos nos estudos de recuperação foram próximos a 100%.

Os resultados apresentados na Tabela 4 também podem ser usados na determinação da estequiometria das drogas analisadas. As razões estequiométricas teóricas são 1:1 para NaDCF, KDCF e DEADCF. No entanto, este resultado só é obtido se a forma correta de sal for utilizada na manipulação (sem substituição de NaDCF por KDCF ou vice-versa) e na ausência de impurezas ou de degradação de DCF. Com base nos resultados apresentados na Tabela 4, pode-se facilmente concluir que apenas a formulação contendo NaDCF apresentou uma relação estequiométrica de 1:1, porque o resultado obtido com o método proposto está muito próximo aos valores teóricos e que constam na bula. Por outro lado, a proporção estequiométrica do KDCF (amostra 2) e DEADCF (amostra 3) não foram semelhantes ao valor teórico (1:1). As concentrações obtidas para K (-20,4%) e para a DEA (-13,7%) foram menores do que os valores rotulados. Esta diferença foi menor para a concentração DCF (-4,7% e -3,5%, respectivamente) nas mesmas amostras. Estes resultados discrepantes pode ser parcialmente explicados pela presença de NaDCF substituindo KDCF ou DEADCF em ambas as amostras. Esta hipótese é suportada pelos eletroferogramas obtidos para amostras de DEADCF e KDCF (Figura 9), pois ambas exibem o pico de Na^+ em seus respectivos eletroferogramas. Esta conclusão também é suportada pelo resultado obtido para DCF nestas amostras, que apresenta concentração mais próxima ao valor declarado na bula do medicamento, tanto por CE- C^4D como por HPLC. Quando a concentração de Na^+ determinada nestas amostras é somada as respectivas concentrações de K^+ e DEA^+ , o valor calculado passa a ser maior do que o valor teórico ou estequiométrico. Assim, é provável que impurezas de sódio também estejam presentes nestas amostras.

Conforme previamente informado neste trabalho, Ca e Mg são adicionados como excipientes inativos nas formulações de NaDCF e KDCF em forma de sais de estearato ou carbonato. Os resultados apresentados até aqui demonstram que nas

amostras analisadas, a concentração destes íons é pequena e não há interferência nos resultados apresentados. No entanto, não tem como afirmar que em todas as formulações disponíveis no mercado, as concentrações de Ca e Mg se encontram nestes níveis de concentração. Em função disto, optamos em realizar estudos para verificar o impacto nos resultados obtidos com o método proposto, caso a concentração destes íons fossem maiores. A Figura 16 apresenta os resultados obtidos com o sistema CE-C⁴D empregando o BGE TRIS/TAPS 10mmol L⁻¹ (pH = 8,2) e a injeção de uma solução padrão contendo K⁺, Na⁺, DEA⁺ e DCF⁻ sem e com adição de Ca²⁺ e Mg²⁺.

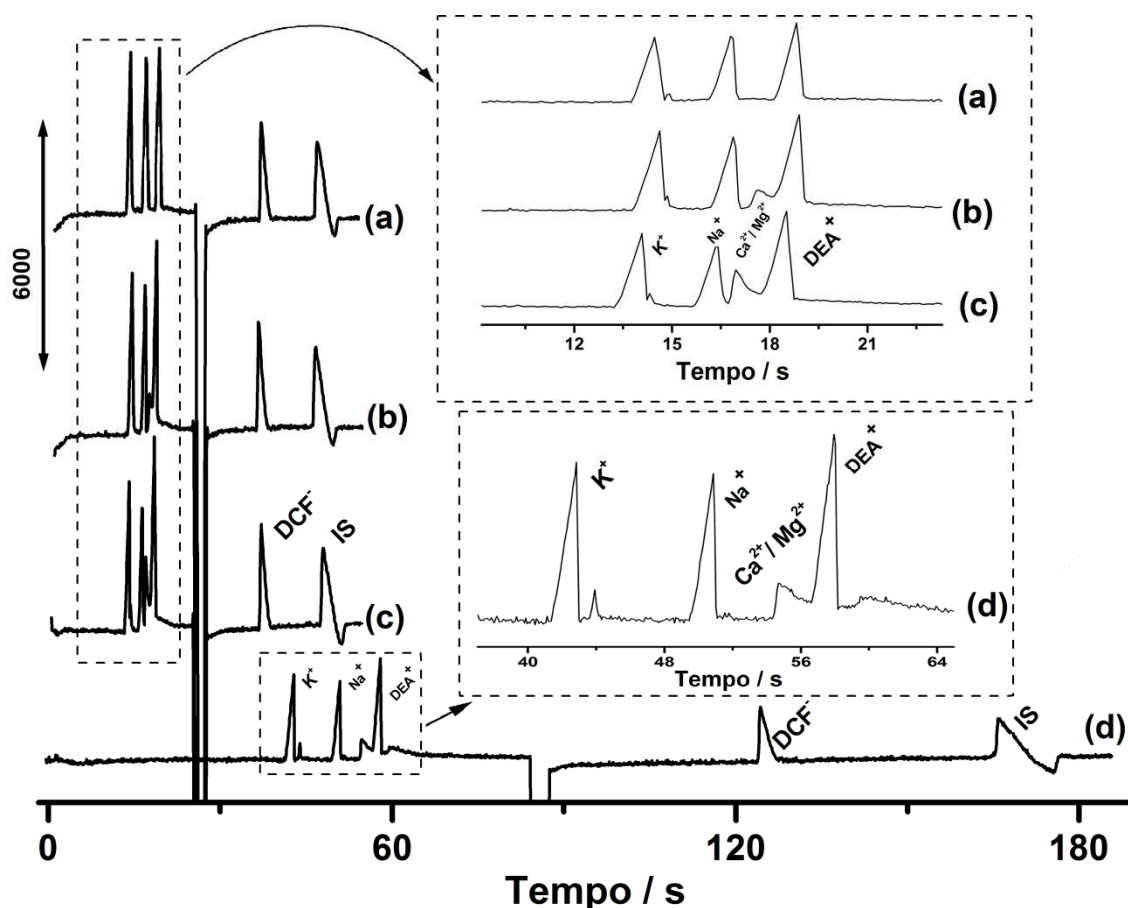


Figura 16 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo K⁺, Na⁺, DEA⁺ e DCF⁻ (300 μmol L⁻¹ cada) (a) sem e (b) com a adição de 50 ou (c, d) 200 μmol L⁻¹ de Ca²⁺ e Mg²⁺. Comprimento efetivo do capilar: (a, b, c) = 10 cm; (d) 30 cm. Demais condições vide Fig. 9.

Conforme pode ser observado, um pico relacionado com Ca^{2+} e Mg^{2+} surge entre os picos do Na^+ e DEA^+ . Soluções contendo simultaneamente Ca^{2+} e Mg^{2+} até uma concentração de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 16c) ainda apresentam uma resolução entre os picos que pode ser considerada aceitável no primeiro detector (comprimento efetivo da capilar = 10 cm). No entanto, em concentrações superiores, a análise nesta condição tende a se tornar inviável. Como o equipamento contém um segundo detector (comprimento efetivo da capilar = 30 cm), um eletroferograma adquirido nesta condição também é apresentado na Fig. 16. Como pode ser visto, nesta condição ainda há uma boa resolução entre o pico de Na^+ e o pico relacionado com Ca^{2+} e Mg^{2+} e a determinação continua sendo possível mesmo na presença de concentrações maiores de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Porém, o tempo de análise aumenta de 1 para 3 minutos. O mesmo não é verdadeiro para a determinação de DEA^+ , pois o pico de Ca^{2+} e Mg^{2+} apresentam tempo de migração muito próximo, o que não chega a ser um problema em amostras farmacêuticas, pois Ca^{2+} e Mg^{2+} não são adicionados como excipientes em amostras de DEADCF.

O método proposto também pode ser útil na determinação rápida do grau de degradação da DCF em matérias-primas ou em formulações farmacêuticas. A Figura 17 mostra dois eletroferogramas de uma solução-padrão contendo simultaneamente $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- antes e após a exposição à irradiação solar por 3 horas. A aparência final das soluções pode ser vista na Figura 18 e fica evidente que ocorreu alguma reação química devido à mudança de cor da solução de translúcida para amarelada.

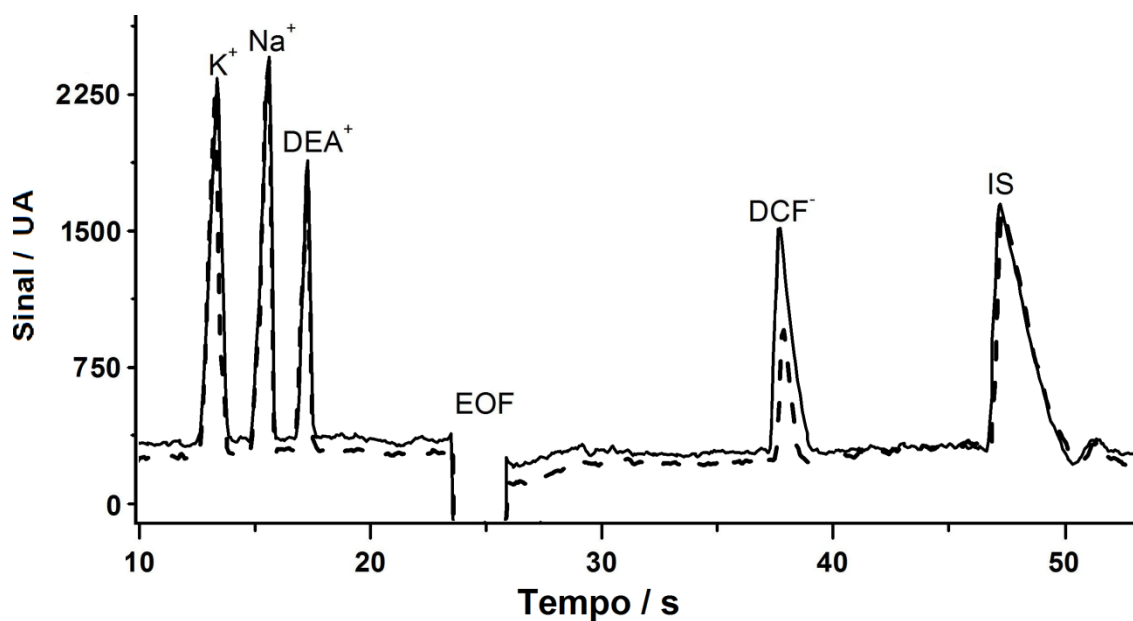


Figura17 - Eletroferogramas de uma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- antes (—) e após (---) exposição por 3 horas a luz solar. Outras condições vide Figura 9.

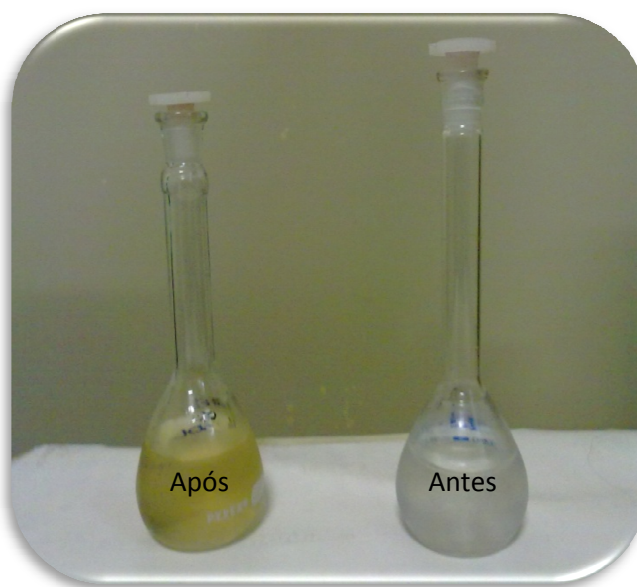


Figure 18 – Imagem das soluções padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de K^+ , Na^+ , DEA^+ e DCF^- antes (solução clara) e após (solução amarelada) exposição por 3 horas a luz solar.

Como se pode observar na Figura 17, os cátions (compostos estáveis) apresentaram picos semelhantes nos eletroferogramas obtidos antes e após a exposição à irradiação solar (teste de fotoestabilidade). No entanto, uma diminuição considerável na área do pico do DCF foi detectada devido à sua fotodegradação (decomposição) em outros produtos [99]. O sistema CE-C⁴D proposto tem limitações na detecção dos produtos de fotodegradação de DCF, pois é provável que seus possíveis produtos de degradação (8-cloro-9H-carbazol-1-il)-acético, ácido 2 - (2-cloro-fenilamino)-benzaldeído, e (1,4-dioxo-4 ,9-di-hidro -1H-carbazol-8-il) acético [99] sejam espécies neutras em pH 8,2 ou apresentem condutividade semelhante ao co-íon do BGE, o que reduz a sensibilidade do C⁴D [23, 24].

4.1.1 - Conclusões parciais

Os resultados expostos neste trabalho demonstram claramente que o método proposto permite não só a determinação rápida e simultânea de DCF e os seus contra-íons, mas também fornece informações sobre a forma de sal, a presença de impurezas e do grau de degradação do ingrediente ativo da formulação (DCF), sendo que todas essas informações são obtidas em uma única análise com tempo inferior a um minuto.

4.2 - Metodologia para determinação rápida de diclofenaco de sódio e fosfato de codeína em formulações farmacêuticas.

Com intuito de continuar os estudos em tema semelhante ao abordado na parte inicial desta dissertação (controle de qualidade de formulações farmacêuticas), optamos em verificar a possibilidade incluir no procedimento proposto a análise de fármacos que possuíam em sua formulação outro princípio ativo, além de DCF. Neste contexto, optamos em trabalhar com um medicamento que contém fosfato de codeína e diclofenaco de sódio na formulação. Simulações iniciais usando o software de simulação Peakmaster [97] indicaram que esta análise seria possível mantendo o tempo de análise, ou seja, em menos de 1 minuto. Estudos iniciais foram realizados usando o mesmo BGE empregado na determinação de DCF e seus respectivos contra íons. No entanto, apesar do pico da codeína apresentar boa resolução neste meio (conforme simulação prévia), a baixa mobilidade (condutividade) do BGE composto por TRIS/TAPS gerou um sinal (pico) de baixa intensidade, provavelmente devido à baixa mobilidade que o cátion codeína também apresenta em solução. Para contornar o problema da proximidade entre as mobilidades do BGE TRIS/TAPS e da COD, duas alternativas podem ser implementadas usando o sistema CE-C⁴D: uso um BGE com mobilidade bem inferior (o que é muito difícil de obter, pois TRIS/TAPS já possui mobilidade baixa) ou uso de um BGE com mobilidade superior. Assim, um estudo para identificar um BGE de alta mobilidade/condutividade, com elevada magnitude de EOF e com boa capacidade tamponante foi realizado.

Na busca de um co-íon de elevada mobilidade, a trietanolamina (TEA; pK_a=8,4) se apresentou uma boa candidata para fazer parte do BGE e assim contornar o problema de sensibilidade em relação à codeína. Alguns ácidos foram testados para compor a solução tampão com esta amina, como: (A) ácido oxálico, (B) ácido sulfúrico, (C) ácido

lático e (D) ácido fosfórico. A Figura 19 apresenta os eletroferogramas obtidos com estes BGEs com a injeção de solução contendo NaDCF, fosfato de codeína e lítio como IS.

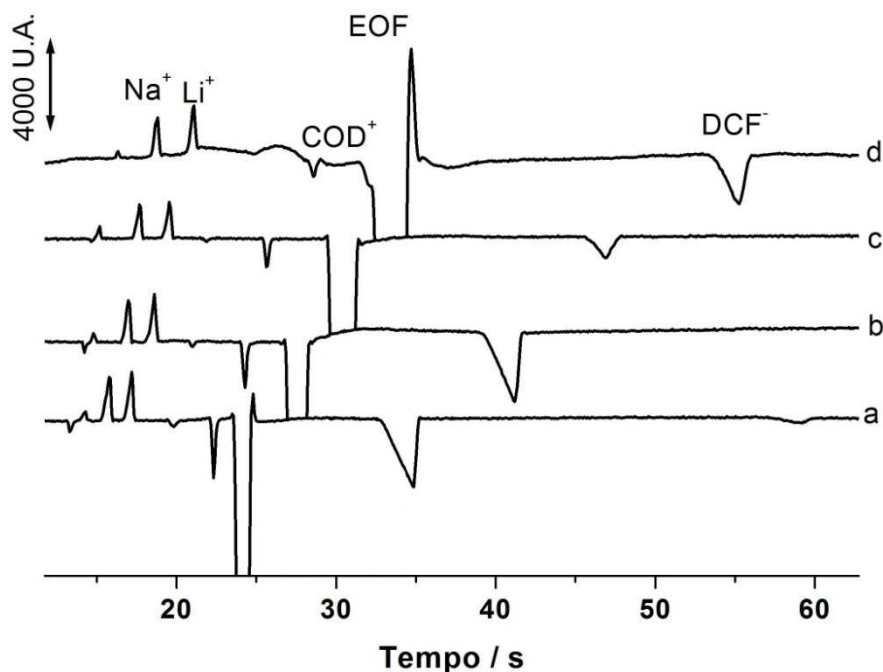


Figura 19 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo NaDCF e fosfato de COD ($700 \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) usando um BGE composto por TEA 10 mmol L^{-1} com pH acertado em 8,4 com: (a) ácido oxálico, (b) ácido sulfúrico, (c) ácido lático e (d) ácido fosfórico. Condições: EOF: normal; potencial aplicado: 25 kV, comprimento efetivo do capilar: 10 cm, injeção hidrodinâmica = 25 kPa por 0,6 s, diâmetro interno do capilar: 50 μm ; IS: Li^+ $600 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Como pode ser visto pela Figura 19, o BGE composto por TEA/ácido oxálico ($10/1,8 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente, $\text{pH} = 8,4$) apresentou o melhor resultado considerando sensibilidade e velocidade de análise. Além disto, apesar da alta mobilidade, este BGE também apresentou boa estabilidade de linha base. A Figura 20 apresenta uma comparação entre o desempenho do BGE composto por TRIS/TAPS

10 mmol L⁻¹ (pH = 8,2) e por TEA/ácido oxálico (10/1,8 mmol L⁻¹, pH = 8,4) na análise de uma solução contendo simultaneamente NaDCF e fosfato de COD (500 µmol L⁻¹ cada).

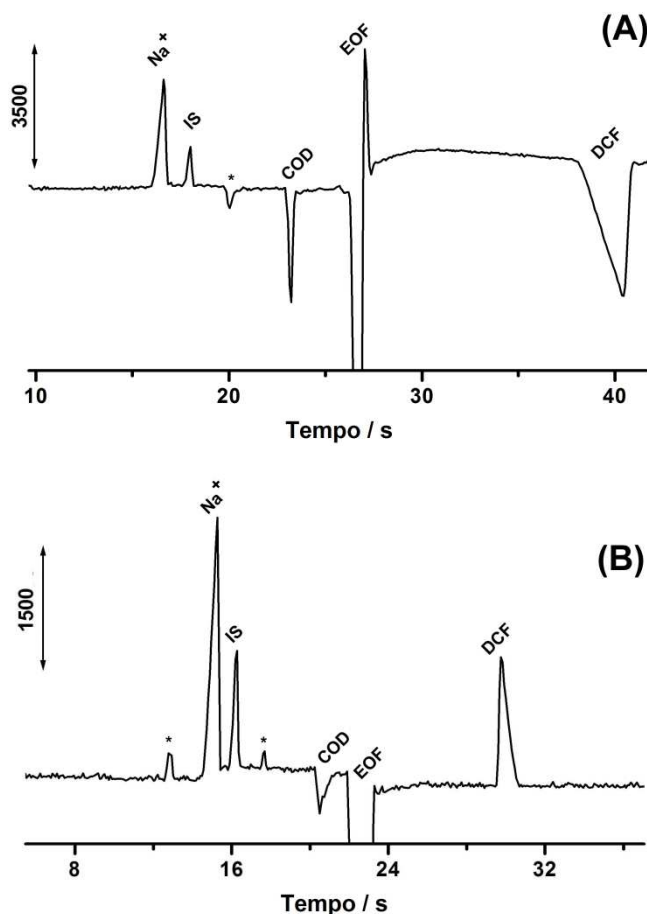


Figura 20 – Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo 500 µmol L⁻¹ de fosfato de COD e NaDCF em função do BGE utilizado: (A) TEA/ácido oxálico (10/1,8 mmol L⁻¹, pH = 8,4) e (B) TRIS/TAPS 10 mmol L⁻¹ (pH 8,2). Outras condições vide figura 19.

Os resultados apresentados na Fig. 19 demonstram que o BGE composto TEA/ácido oxálico apresenta um pico bem definido para COD e com melhor detectabilidade do que no BGE composto por TRIS/TAPS. Adicionalmente, este BGE ainda permite a caracterização estequiométrica do NaDCF (útil na determinação da

pureza e grau de degradação), pois o pico relacionado com Na^+ continua sendo detectado, apesar do aumento na mobilidade/condutividade do BGE. Por outro lado, os resultados obtidos demonstraram que a caracterização estequiométrica do fosfato de codeína não é possível nesta condição, pois o ânion fosfato apresenta elevada mobilidade na direção contrária ao EOF e sua detecção não se torna viável devido ao elevado tempo necessário para sua chegada ao detector e conseqüente deformação/alargamento de seu pico.

Conforme consta na bula do medicamento comercial que contém em sua composição NaDCF e fosfato de COD, excipientes inativos contendo sódio e fosfato são adicionados na formulação e, portanto, a caracterização estequiométrica destes compostos nestas formulações não é mais possível. No entanto, além da possibilidade de determinação rápida e simultânea de DCF e COD nestas formulações, o método ainda pode ser útil na caracterização estequiométrica e determinação da pureza e grau de degradação da matéria prima. Em função disto, estudos foram direcionados para que este objetivo fosse atingido.

Em outra tentativa de efetuar a caracterização estequiométrica em uma única etapa (determinação simultânea de todas as espécies de interesse: Na^+ , COD^+ , DCF^- e PO_4^{3-}), CTAOH $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ foi adicionado ao BGE com intuito de se inverter o EOF. Nesta condição, os ânions são analisados migrando na mesma direção do EOF e os cátions migrando contra o EOF. A Figura 21 apresenta os eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão contendo NaDCF e fosfato de COD ($500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) usando como BGE TEA/ácido oxálico ($10/1,8 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,4$) sem e com a adição de CTAOH $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ para inversão do EOF.

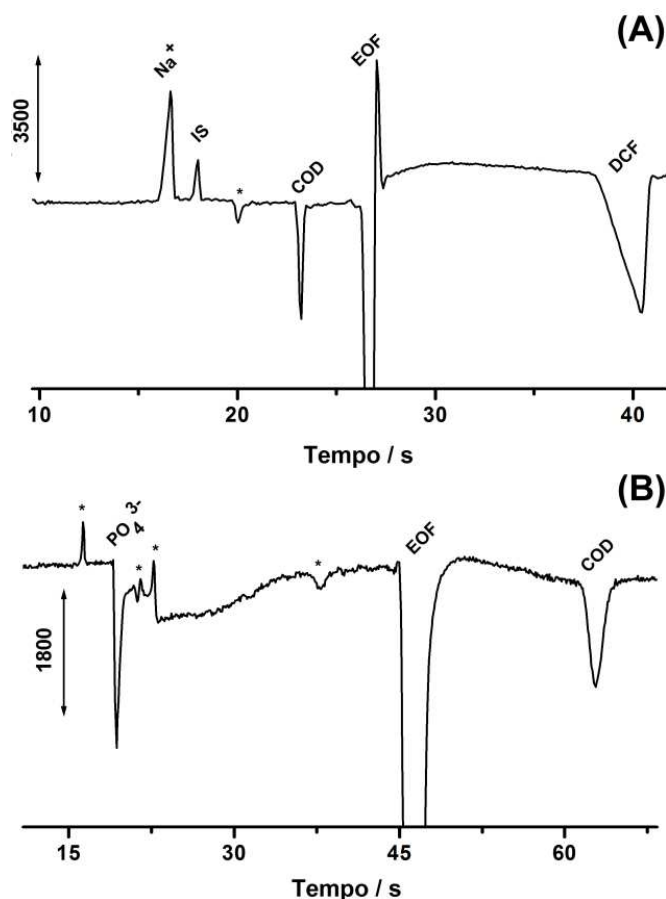


Figura 21 – Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato de COD e NaDCF usando como BGE TEA/ácido oxálico ($10/1,8 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH} = 8,4$) sem (A) e com (B) a adição de CTAOH $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. IS: Li^+ $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Outras condições vide Figura 19.

Como pode ser observado, sem a inversão do EOF (Fig. 21 A) é possível a determinação rápida e simultânea de Na^+ , COD e DCF. Com a inversão do EOF (Fig. 21 B), somente fosfato e COD foram detectados e assim como em estudos anteriores, na presença reagente responsável pela inversão do EOF, o DCF não foi detectado devido a provável interação com o CTAOH. Além disto, o pico do fosfato apresentou deformações próximo a sua cauda, provavelmente gerados por picos de sistema, uma vez que uma solução padrão foi usada no estudo.

Em função destes resultados, uma solução contendo TEA/ácido oxálico (10/1,8 mmol L⁻¹, pH = 8,4) foi adotada como BGE nos demais estudos para determinação simultânea de COD e DCF em formulações farmacêuticas. Na Figura 22 são apresentados eletroferogramas de uma solução padrão e amostra usando TEA/ácido oxálico (10/1,8 mmol L⁻¹, pH = 8,4) como BGE.

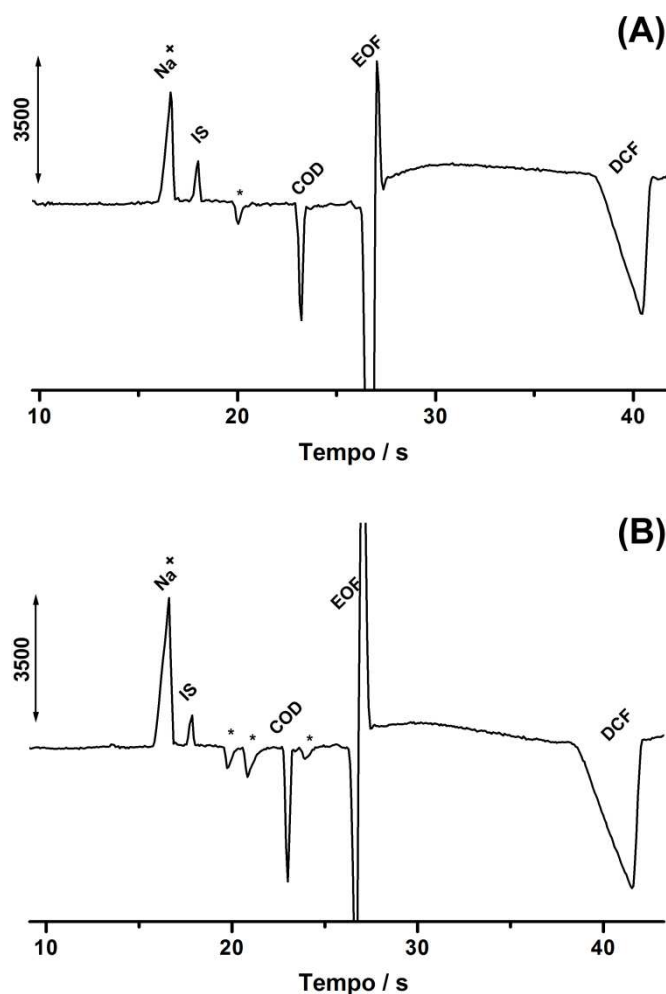


Figura 22 –Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma (A) solução padrão contendo 500 µmol L⁻¹ de fosfato de COD e NaDCF e de uma (B) solução amostra apropriadamente diluída. BGE: TEA/ácido oxálico (10/ 1,8 mmol L⁻¹; pH 8,4). IS: Li⁺ 100 µmol L⁻¹. Outras condições vide Figura 19.

Como pode ser observado, os eletroferogramas da solução amostra e padrão são similares, o que permite concluir que existe boa probabilidade de obtenção de sucesso na determinação rápida e simultânea de COD e DCF usando o sistema CE- C^4D proposto. Picos de origem desconhecida (*) estão presentes na solução amostra, mas é provável que os mesmos não interfiram na determinação de COD e DFC.

O passo seguinte foi realizar estudos para otimização do método proposto, a influência de parâmetros como tempo de injeção (hidrodinâmica a pressão constante) foram estudados. Na Figura 23 são apresentados os resultados obtidos do estudo de variação do tempo de injeção.

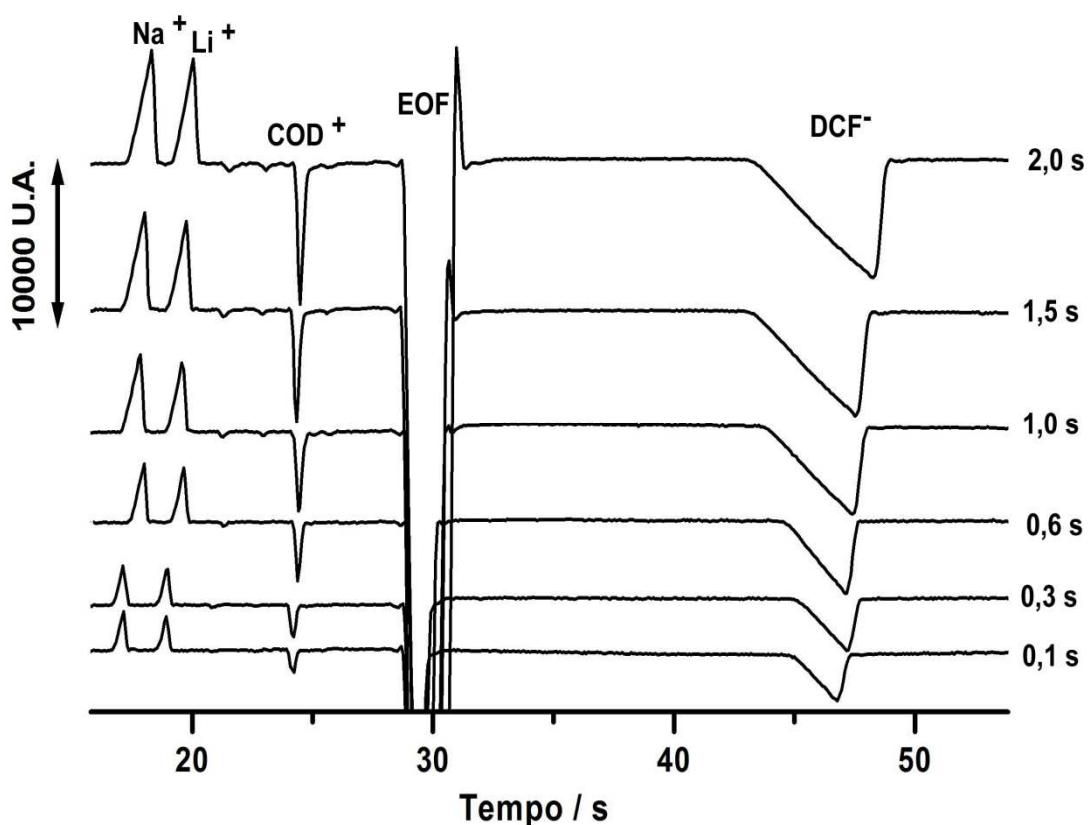


Figura 23 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato de COD e NaDCF. Pressão constante de injeção: 25 kPa; Demais condições experimentais: idem Fig. 22.

Em relação aos tempos de injeção (Fig. 23), é possível observar uma melhora na sensibilidade com o aumento no tempo de injeção, pois resulta no aumento no volume injetado e em todos os casos, a determinação seria possível, no entanto a opção ocorreu por um tempo intermediário de 0,6 s (25 kPa).

Empregando os parâmetros otimizados anteriormente (BGE, tempo de injeção, potencial de separação), a estabilidade do sistema foi testada e é mostrada na Figura 24 com injeções sucessivas (estudo de repetibilidade) de uma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato de COD e NaDCF. Os resultados estatísticos calculados a partir dos dados desta figura estão apresentados na Tabela 5.

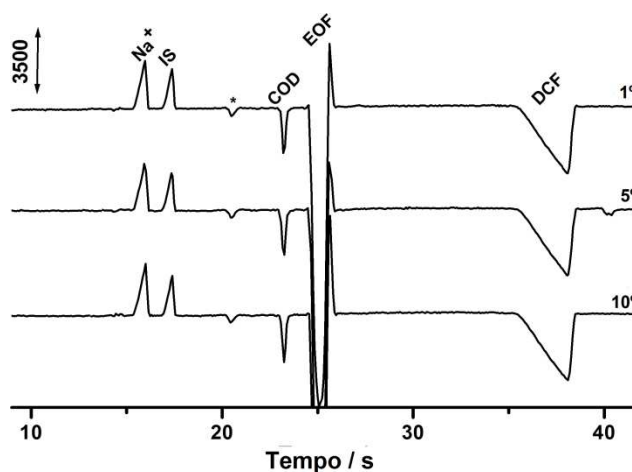


Figura 24 – Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato de COD e NaDCF. IS: Li^+ $350 \mu\text{mol L}^{-1}$. Outras condições vide Figura 22.

Tabela 5 - Características analíticas do método proposto.

| Analito | Tempo de migração ^a | Área do pico ^a | LOD ^b | LOQ ^c | R ^d |
|------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|
| | (s) | | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol L}^{-1}$) | |
| Na ⁺ | 17,3 \pm 0,04 | 19,3 \pm 0,3 | 6,8 | 22,4 | - |
| Li ⁺ | 18,6 \pm 0,08 | 13,6 \pm 0,2 | - | - | 1,43 \pm 0,04 |
| COD ⁺ | 28,4 \pm 0,11 | 11,2 \pm 0,3 | 21,4 | 71,3 | 7,11 \pm 0,16 |
| DCF ⁻ | 37,7 \pm 0,13 | 111,2 \pm 0,8 | 11,3 | 37,7 | 5,59 \pm 0,09 |

^aMédia \pm DP (n = 10); ^bpara SNR = 3; ^cpara SNR = 10; ^dResolução entre o pico correspondente e o pico anterior

O estudo de repetibilidade mostra que o sistema CE-C⁴D proposto apresentou boa estabilidade em sucessivas injeções (n = 10) sem a necessidade de renovação da solução no interior do capilar (“flush”) para restituir as condições experimentais iniciais. Após a realização dos estudos de otimização do método e confirmada sua estabilidade pelo estudo de repetibilidade um teste de para checar a faixa linear de resposta das espécies a serem estudadas foi realizado (Figura 25).

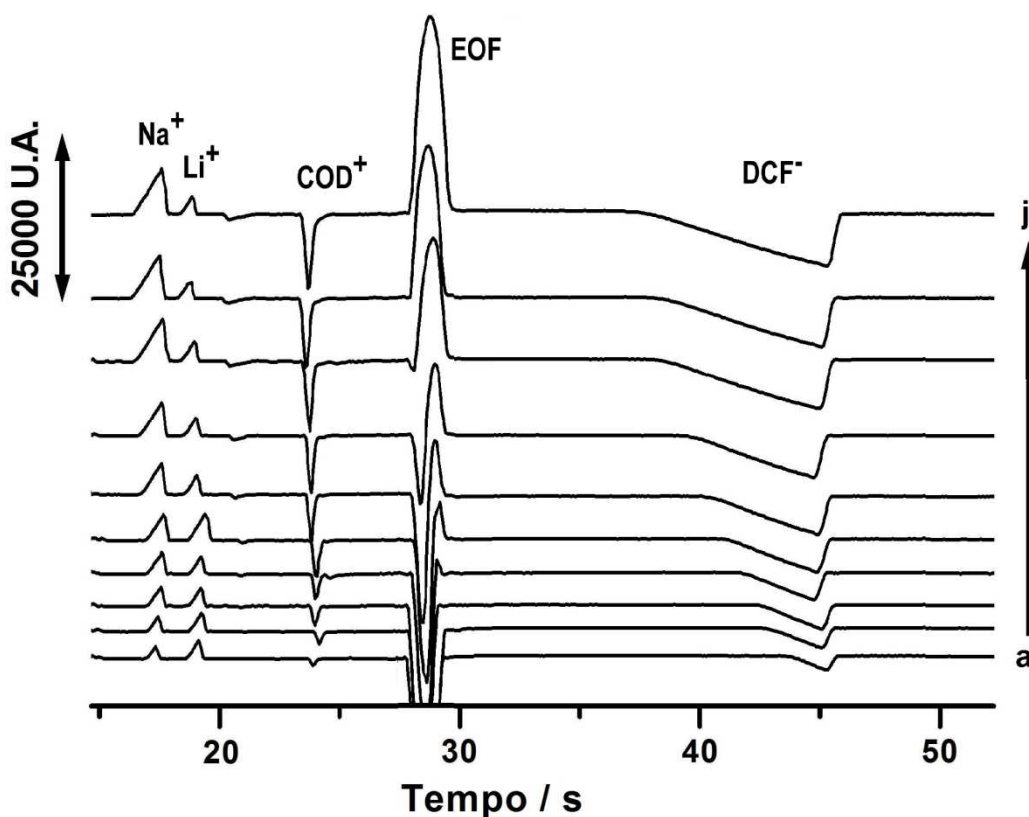


Figura 25 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de fosfato de COD e NaDCF (a:200; b:350; c:500; d:700; e:900; f:1200; g:1500; h:2000; i:2500 e j:3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com coeficientes de correlação de 0,993; 0,988 e 0,986 para Na, COD e DCF, respectivamente. Demais condições vide Fig. 22.

Conforme apresentado na Fig. 25, até mesmo em elevadas concentrações se tem resolução entre todos os analitos. Dentre esta faixa linear, uma outra faixa menor foi adotada para se realizar a construção de uma curva analítica de calibração. A Figura 26 apresenta os eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de Na^+ , COD^+ e DCF^- (250 - 1250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com incrementos de 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as suas respectivas curvas de calibração.

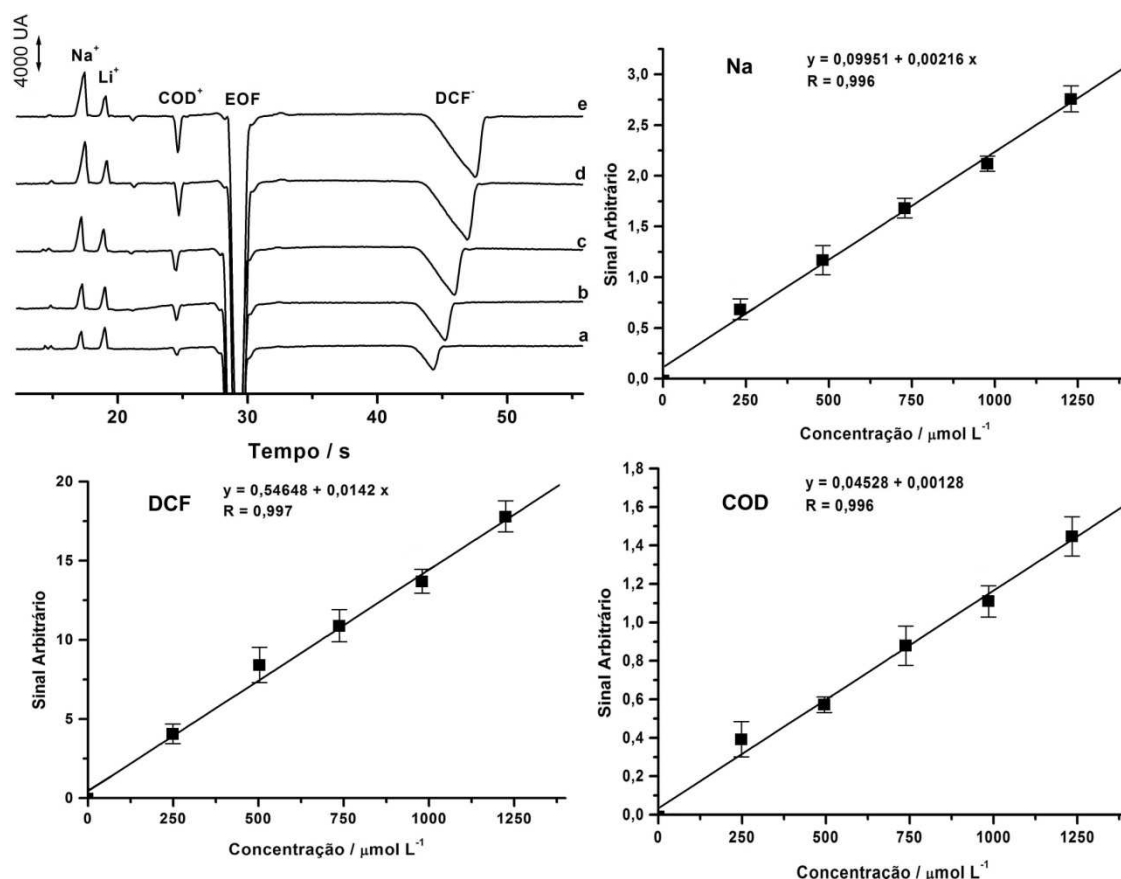


Figura 26 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de Na⁺, COD⁺ e DCF⁻ (250 - 1250 μmol L⁻¹, com incrementos de 250 μmol L⁻¹) e as suas respectivas curvas de calibração obtidas. Outras condições vide Figura 22.

As curvas de calibração obtidas a partir dos eletroferogramas apresentados na Fig. 26 apresentaram boa linearidade para todos os analitos no intervalo de concentrações entre 250 e 1250 μmol L⁻¹, com a obtenção de coeficientes de correlação superiores a 0,996 em todos os casos. As curvas de calibração (Fig. 26) foram usadas para checar a precisão do método mediante a análise de duas amostras farmacêuticas contendo simultaneamente COD e DCF. Na Tabela 6, os resultados obtidos com o método proposto são comparados aos obtidos por HPLC.

Tabela 6 -Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de COD⁺ e DCF⁻ via CE-C⁴D e HPLC (n = 3).

| Amostra | | Bula/ mg/comprimido | Resultados | Resultados | Erro % | |
|---------|-----|------------------------|------------|------------|----------------|----------------|
| | | | HPLC | CE | E ₁ | E ₂ |
| A1 | COD | 38,0 | 34,8 ± 0,6 | 34,5 ± 0,9 | -8,9 | -0,5 |
| | DCF | 46,4 | 42,2 ± 0,8 | 41,8 ± 1,1 | -9,6 | -0,7 |
| A2 | COD | 38,0 | 37,4 ± 0,7 | 37,1 ± 1,2 | -2,1 | -0,7 |
| | DCF | 46,4 | 46,2 ± 1,0 | 45,9 ± 1,1 | -0,9 | -0,6 |

Resultados em mg/comprimido; E₁: Diferença entre o método CE-C⁴D proposto e o valor que consta na bula; E₂:Diferença entre o método CE-C⁴D proposto e o método de referência (HPLC).

Como pode ser visualizado na Tabela 6, os resultados obtidos com o método proposto diferem em torno de 9% dos valores rotulados na bula do medicamento na amostra A1 para ambos os princípios ativos. Na outra amostra (A2), os resultados foram próximos. No entanto, os resultados obtidos pelo método proposto de CE-C⁴D são similares aos obtidos na validação por HPLC, tanto para COD quanto para DCF. Os valores estatísticos do teste *t-student* foram menores que o valor crítico teórico de 2,78 (n=3) indicando que não há diferenças entre os métodos a um nível de confiança de 95%.

Novamente um estudo sobre a fotodegradação dos compostos foi realizado com o objetivo de verificar se o método proposto permite detectar a decomposição do princípio ativo na matéria prima. A Figura 27 mostra os eletroferogramas de duas soluções padrão contendo 500 µmol L⁻¹ de NaDCF (A) e 500 µmol L⁻¹ de fosfato de COD (B) antes e após a exposição à irradiação solar por diferentes períodos de tempo.

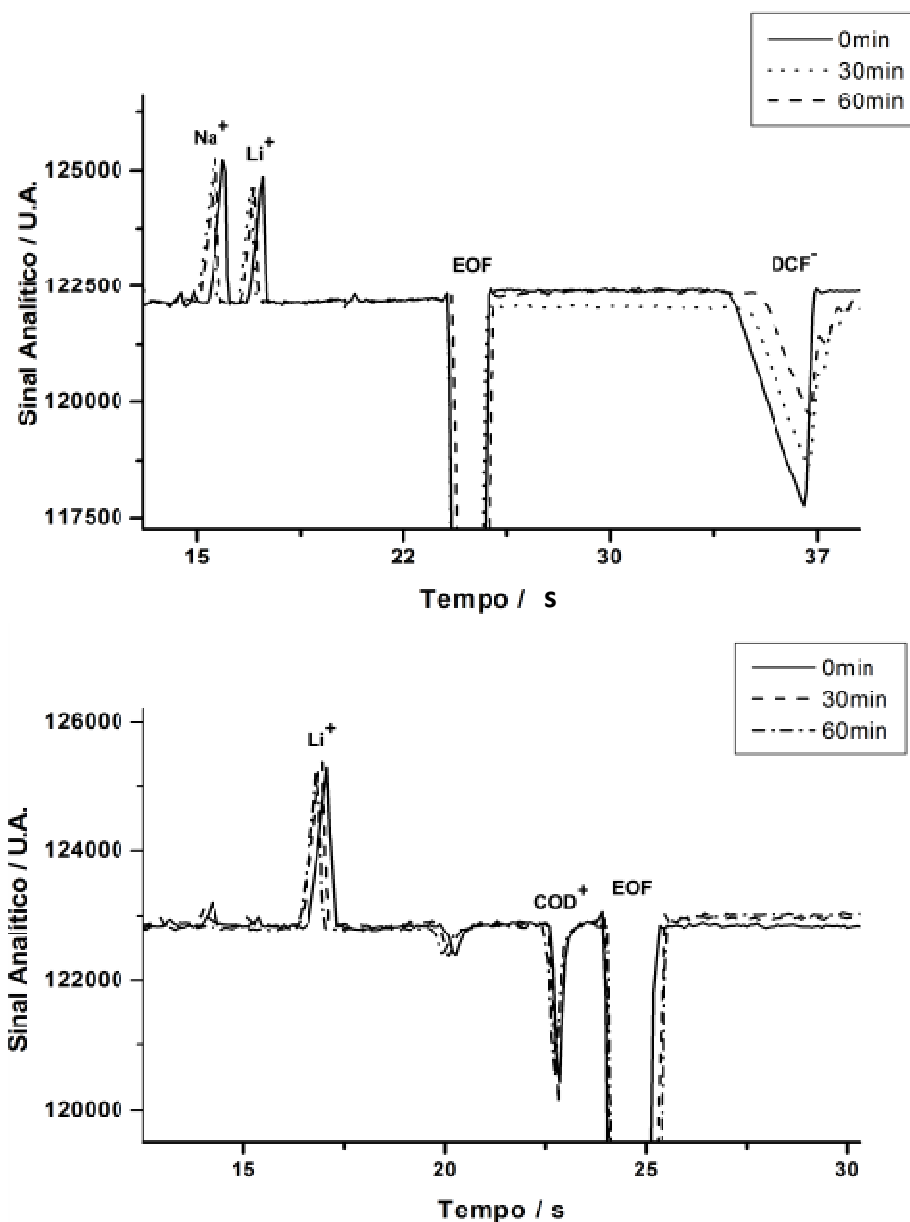


Figura 27 - Eletroferogramas de uma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Na^+ , DCF^- , e COD^+ em diferentes tempos de exposição à luz solar. Outras condições vide Figura 22.

Como esperado e de forma semelhante ao método discutido na primeira parte deste trabalho, o método permite efetuar a caracterização estequiométrica do NaDCF e detectar a degradação do DCF , mas somente no material usado como matéria prima,

uma vez que sais a base de sódio são adicionados na formulação do medicamento com excipientes inativos. A solução contendo COD, por sua vez, mesmo após exposição à luz solar por uma hora não apresentou sinais de degradação, pois não houve variação na área do pico relacionado com a COD e picos adicionais também não foram detectados, o que permite concluir que o fármaco possui maior estabilidade em solução do que o DCF.

4.2.1- Conclusão parcial

Os resultados expostos neste trabalho demonstraram que o método proposto permite a determinação rápida e simultânea de COD e DCF em formulações farmacêuticas e em matéria prima. O método também permite analisar rapidamente o grau de degradação do princípio ativo e determinar a presença de impurezas com o estudo estequiométrico entre os pares de íons fosfato/codeína e diclofenaco/sódio na matéria prima. No entanto, a determinação estequiométrica de ambos os princípios ativos não é possível com o mesmo procedimento, já que não é possível detectar o DCF e sódio com o EOF invertido (determinação de fosfato e COD) e a detecção de fosfato não é possível quando DCF é detectado usando o EOF normal.

5 – Conclusões gerais e perspectivas futuras

Com o desenvolvimento dos métodos propostos neste trabalho podemos afirmar que os objetivos propostos inicialmente foram alcançados em relação à determinação rápida e simples de sódio, potássio, dietilamônio, diclofenaco (DCF), codeína (COD) e fosfato presentes em formulações farmacêuticas utilizando a técnica de CE-C⁴D. Além deste fato, ainda pode-se concluir que ambos os métodos propostos podem ser utilizados na determinação tanto da pureza dos princípios ativos quanto no grau de degradação destes.

Em relação à determinação rápida e simultânea de DCF e seus contra-íons comuns: sódio, potássio e dietilamônio, a estratégia apropriada foi à utilização do BGE composto por concentração equimolar de TRIS/TAPS 10 mmol L⁻¹ (pH = 8,2). Esta estratégia proporcionou a separação e determinação dos quatro analitos em menos de 1 minuto com obtenção de informações adicionais sobre a estequiometria dos sais e do grau de degradação do diclofenaco, tanto na matéria prima como em formulações farmacêuticas. A frequência analítica obtida neste trabalho foi quatro vezes mais rápida em relação à apresentada na literatura por empresas como Shimadzu® [35] e Dionex® [36], as quais fornecem procedimentos específicos para realizar a determinação simultânea de princípios ativos e seus respectivos contra-íons em formulações farmacêuticas.

O BGE composto por trietanolamina/oxalato 10/1,8 mmol L⁻¹ (pH = 8,4) demonstrou ser o mais apropriado para a determinação rápida (em menos de 1 minuto) e simultânea de COD e DCF em medicamentos. Devido à adição de excipientes contendo fosfato e sódio (contra-íons da COD e DCF, respectivamente) em formulações comerciais, este procedimento somente permite obter informações sobre a estequiometria dos sais e degradação dos princípios ativos na matéria prima. No

entanto, este método não possibilitou a determinação simultânea dos quatro íons e informações sobre a estequiometria e grau de degradação sobre os dois sais não podem ser obtidas em uma única análise. Sódio e DCF somente podem ser determinados simultaneamente empregando o EOF no modo normal e fosfato e COD com o EOF invertido. O método proposto para determinação de DCF e COD simultaneamente é 7 vezes mais rápido do que outro trabalho localizado na literatura [92], o qual também faz uso de CE.

Devido à elevada frequência analítica e ao baixo consumo de reagentes e amostras (custo e impactos ambientais menores), podemos afirmar que os métodos propostos neste trabalho apresentam significativas vantagens em relação ao uso de HPLC, como os propostos pelas empresas Shimadzu[®] [35] e Dionex[®] [36].

Como perspectivas futuras, estamos propondo investir no desenvolvimento de novos métodos rápidos para controle de qualidade de outros medicamentos para ampliar a aplicabilidade de sistemas de CE-C⁴D. O foco será direcionado à formulações contendo paracetamol, pois devem existir em torno de 23 medicamentos de composições diferentes no mercado.

6 - Referências bibliográfica

1. Tiselius, A., *The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins*. -Uppsala 1930. 107 S. 4^o (Nova Acta Reg. Societatis scient. Upsaliensis. Ser. 4, vol. 7,4). **1930** Almqvist & Wiksell.
2. Hjerten, S., *Free zone electrophoresis*. Chromatographic Reviews, **1967** 9(2): p. 122-219.
3. Hjerten, S., *High-performance electrophoresis - the electrophoretic counterpart of high-performance liquid-chromatography*. Journal of Chromatography, **1983** 270(NOV): p. 1-6.
4. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, T., *Concentration distributions in free zone electrophoresis*. Journal of Chromatography, **1979** 169: p. 1-10.
5. Jorgenson, J.W., Lukacs K.D., *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*. Analytical Chemistry, **1981** 53(8): p. 1298-1302.
6. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Capillary zone electrophoresis*. Science, **1983** 222(4621): p. 266-272.
7. Heiger, D.N., *High Performance Capillary Electrophoresis*. Hewlett Packard Company, **1997** Publication Number 12-5091-6199E.
8. Zanolli filho, Luiz Antonio. Desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de qualidade de anti-retrovirais em medicamentos utilizando eletroforese capilar. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, University of São Paulo, São Paulo, **2007**. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46133/tde-31102007-103414/>>. Acesso em: **2013-03-05** às 10:30h.
9. Tavares, M.F.M., *Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar*. Química Nova, **1997** 20: p. 493-511.

10. Terabe, S., Matsubara, N., *Microemulsion electrokinetic chromatography - comparison with micellar electrokinetic chromatography*. Journal of Chromatography, **1992** 608(1-2): p. 23-29.
11. Segato, M.P., Silva, C.s.R., Jardim, I.C.S.F., *Eletrocromatografia capilar: contextualizaçãoo, estado da arte e perspectivas*. Química Nova, **2009** 32: p. 431-440.
12. Carvalho, Alexandre Zatkovskis. Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato à determinação de espécies neutras. 2003. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2003** Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46133/tde-10072008-103654/>. Acesso em: **2013-03-05** às 11:00h.
13. Henderson, R.K., Baker, A., Murphya, K.R., Hamblya, A., Stuetza, R.M., Khana, S.J., *Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review*. Water Research, **2009** 43(4): p. 863-881.
14. Mark, J.J.P., Scholz, R., Matysik, F.M., *Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **2012** 1267(0): p. 45-64.
15. Sisk, G.D., Herzog, G., Glennon, J.D., Arrigan, D.W., *Assessment of ion transfer amperometry at liquid-liquid interfaces for detection in CE*. Electrophoresis, **2009** 30(19): p. 3366-3371.
16. Silva, J.A.F., *Detecção eletroquímica em eletroforese capilar*. Química Nova, **2003** 26: p. 56-64.
17. Šolínová, V., Kašička,V., *Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis*. Journal of Separation Science, **2006** 29(12): p. 1743-1762.
18. Zemann, A.J., *Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, **2003** 24(12-13): p. 2125-2137.

19. Haque, A., Stewart, J.T., *Simultaneous determination of codeine, caffeine, butalbital, and aspirin by free solution capillary electrophoresis*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1999** 22(8): p. 1193-1204.
20. Nehmé, R., Lascaux, A., Delépée, R., Claude, B., Morin, P., *Capillary electrophoresis procedure for the simultaneous analysis and stoichiometry determination of a drug and its counter-ion by using dual-opposite end injection and contactless conductivity detection: Application to labetalol hydrochloride*. Analytica Chimica Acta, **2010** 663(2): p. 190-197.
21. Fracassi da Silva, J.A., do Lago C.L., *Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector*. Electrophoresis, **2000** 21(7): p. 1405-1408.
22. Fracassi da Silva, J.A., do Lago, C.L., *An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, **1998** 70(20): p. 4339-4343.
23. Brito-Neto, J.G.A., Fracassi da Silva, J.A., Blanes, L., do Lago C.L., *Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals*. Electroanalysis, **2005** 17(13): p. 1198-1206.
24. Brito-Neto, J.G.A., Fracassi da Silva, J.A., Blanes, L., do Lago C.L., *Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics*. Electroanalysis, **2005** 17(13): p. 1207-1214.
25. Elbashir, A.A., Aboul-Enein, H.Y., *Recent advances in applications of capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C4D): an update*. Biomedical Chromatography, **2012** 26(8): p. 990-1000.
26. Marsh, A., Altria, K. *Use of multiplexed CE for pharmaceutical analysis*. Chromatographia, **2006** 64(5-6): p. 327-333.

27. Opekar, F., Coufal, P., Stulik, K., *Rapid Capillary Zone Electrophoresis Along Short Separation Pathways and Its Use in Some Hyphenated Systems: A Critical Review*. Chemical Reviews, **2009** 109(9): p. 4487-4499.
28. Matysik, F.-M., *Advances in fast electrophoretic separations based on short capillaries*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2010** 397(3): p. 961-965.
29. Piovezan, M., *Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples*. Analytica Chimica Acta, **2010** 673(2): p. 200-205.
30. da Silva, J.A.F., de Castro, N.V., de Jesus, D.P., Faria, A.F., de Souza, M.V., de Oliveira, M.A., *Fast determination of ethambutol in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Electrophoresis, **2010** 31(3): p. 570-574.
31. Cherkaoui, S., Geiser, L., Veuthey, J.L., *Rapid separation of basic drugs by nonaqueous capillary electrophoresis*. Chromatographia, **2000** 52(7-8): p. 403-407.
32. Costa, A.C.O., Perfeito, L.S, Tavares, M.F., Micke, G.A., *Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis - Optimization of the method with inspection of ionic mobilities*. Journal of Chromatography A, **2008** 1204(1): p. 123-127.
33. Micke, G.A., Costa, A.C., Heller, M., Barcellos, M., Piovezan, M., Caon, T., de Oliveira, M.A., *Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol-Total analysis time reduction strategies*. Journal of Chromatography A, **2009** 1216(45): p. 7957-7961.
34. Laborde-Kummer, E., Gaudin, K., Joseph-Charles, J., Gheyouche, R., Boudis, H., Dubost, J.P., *Development and validation of a rapid capillary electrophoresis method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu (R) and generic versions*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2009** 50(3): p. 544-546.

35. <http://www2.shimadzu.com/applications/LC/IC%20L387.pdf>, acessado às 10:30h de 05/03/2013 .
36. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/87447-PO-IICS-API-Counterion-CAD-18Oct2010-LPN2610-01.pdf>, acessado às 10:30h de 05/03/2013 .
37. Calisevici, M.N., Perju, D., Dumitrel, G.A., Glevitzky, M., Moldovan, R.C., *Determination of anion and cation contents in Cyprus drinking waters by HPIC method*. Journal of Food Agriculture & Environment, **2011** 9(1): p. 65-68.
38. Meng, H.B., Wang, T.R., Guo, B.Y., Hashi, Y., Guo, C.X., Lin, J.M., *Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography*. Talanta, **2008** 76(2): p. 241-245.
39. Crafts, C., Bailey, B., Plante, M., Acworth, I., *Evaluation of Methods for the Simultaneous Analysis of Cations and Anions Using HPLC with Charged Aerosol Detection and a Zwitterionic Stationary Phase*. Journal of Chromatographic Science, **2009** 47(7): p. 534-539.
40. Saarinordhaus, R., Anderson, J.M., *Simultaneous analysis of anions and cations by single-column ion chromatography*. Journal of Chromatography, **1991** 549(1-2): p. 257-264.
41. Thanh Duc, M., Hauser, P.C., *Simultaneous separations of cations and anions by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection employing a sequential injection analysis manifold for flexible manipulation of sample plugs*. Journal of Chromatography A, **2012** 1267: p. 266-272.
42. Kuban, P., Karlberg, B., Kuban, V., *Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection*. Journal of Chromatography A, **2002** 964(1-2): p. 227-241.
43. Weekley, B.S., Foley, J.P., *Dual-opposite-injection CZE: Theoretical aspects and application to organic and pharmaceutical compounds*. Electrophoresis, **2007** 28(4): p. 697-711.

44. Lopez, C., Nehme, R., Claude, B., Morin, Ph., Max, J. P., Pena, R., Pelissou, M., Ribet, J.P., *A Convenient Approach to Simultaneous Analysis of a Pharmaceutical Drug and Its Counter-Ion by CE Using Dual-Opposite End Injection and Contactless Conductivity Detection*. *Chromatographia*, **2012** 75(1-2): p. 25-32.
45. Padaruskas, A., *Dual-opposite injection capillary electrophoresis for the simultaneous separation of anionic and cationic compounds*. *Current Analytical Chemistry*, **2005** 1(2): p. 149-156.
46. Priego-Capote, F., de Castro, M.D.L., *Dual injection capillary electrophoresis: Foundations and applications*. *Electrophoresis*, **2004** 25(23-24): p. 4074-4085.
47. Johns, C., Yang, W., Macka, M., Haddad, P.R., *Simultaneous separation of anions and cations by capillary electrophoresis with high magnitude, reversed electroosmotic flow*. *Journal of Chromatography A*, **2004** 1050(2): p. 217-222.
48. Gallagher, P.A., Danielson, N.D., *Capillary electrophoresis of cationic and anionic surfactants with indirect conductivity detection*. *Journal of Chromatography A*, **1997** 781(1-2): p. 533-540.
49. Foret, F., Fanali, S., Ossicini, L., *Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography*, **1989** 470(1): p. 299-308.
50. Shamsi, S.A., Danielson, N.D., *Individual and simultaneous class separations of cationic and anionic surfactants using capillary electrophoresis with indirect photometric detection*. *Analytical Chemistry*, **1995** 67(22): p. 4210-4216.
51. Tomoyoshi, S., Ross, G.A., *Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, **1999** 834(1-2): p. 65-71.
52. Sarazin, C., Delaunay, N., Varenne, A., Costanza, C., Eudes, V., Gareil, P., *Simultaneous capillary electrophoretic analysis of inorganic anions and cations in post-blast extracts of acid-aluminum mixtures*. *Journal of Separation Science*, **2010** 33(20): p. 3177-3183.

53. Krokhin, O.V., Hoshinob, H., Shpiguna, O.A, Yotsuyanagib, T., *Use of cationic polymers for the simultaneous determination of inorganic anions and metal-4-(2-pyridylazo)resorcinolato chelates in kinetic differentiation-mode capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **1997** 776(2): p. 329-336.
54. <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=diclofenac&source=fp>, acessado às 10:30h de 05/03/2013 .
55. Bester-Rogac, M., *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Ion Mobility: A Conductometric Study of Salicylate, Naproxen, Diclofenac and Ibuprofen Dilute Aqueous Solutions*. Acta Chimica Slovenica, **2009** 56(1): p. 70-77.
56. Hajkova, R., Solicha, P., Pospíšilová, M., Šíchab, J., *Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography*. Analytica Chimica Acta, **2002** 467(1-2): p. 91-96.
57. Derry, P., Derry, S., Moore, R.A., McQuay, H.J., *Single dose oral diclofenac for acute postoperative pain in adults*. Cochrane Database of Systematic Reviews, **2009** (2): p. 68.
58. Ahmad, M., Muhammad, I., Naveed, A.; Ghulam; M., Muhammad, M., Rasool, A., *Comparison of Bioavailability and Pharmacokinetics of Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium in Healthy and Escherichia coil Induced Febrile Rabbits*. Pakistan Journal of Zoology. **2010** 42(4): p. 395-400.
59. Barba, G., Cappuccio, F.P., Russo, L., Stinga, F., Iacone, R., Strazzullo, P., *Renal function and blood pressure response to dietary salt restriction in normotensive men*. Hypertension, **1996** 27(5): p. 1160-1164.
60. Guyton, A.C., Coleman, T.G. , Wilcox, C.S. *Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension*. Journal of the American Society of Nephrology, **1999** 10(10): p. 2248-2249.

61. de Souza, R.L., Tubino, M., *Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations*. Journal of the Brazilian Chemical Society, **2005** 16(5): p. 1068-1073.
62. Sena, M.M., Chaudhry, Z.F., Collins, C.H., Poppi, R.J., *Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2004** 36(4): p. 743-749.
63. Agatonović-Kuštrin, S., Živanović, Lj., Radulović, D., Vasiljević, M., *Experimental-design applied to a spectrophotometric study of a diclofenac sodium-copper(ii) complex*. Analyst, **1991** 116(7): p. 753-756.
64. Fabre, H., Sun, S.W., Mandrou, B., Maillols, H., *Assay validation for an active ingredient in a pharmaceutical formulation - practical approach using ultraviolet spectrophotometry*. Analyst, **1993** 118(8): p. 1061-1064.
65. Arancibia, J.A., Escandar, G.M., *Complexation study of diclofenac with beta-cyclodextrin and spectrofluorimetric determination*. Analyst, **1999** 124(12): p. 1833-1838.
66. Lansdorp, D., Lansdorp, D., Janssen, T., Guelen, P., Vree, T., *High-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, **1990** 528(2): p. 487-494.
67. Wiese, B., Hermansson, J., *Bioanalysis of diclofenac as its fluorescent carbazole acetic-acid derivative by a postcolumn photoderivatization high-performance liquid-chromatographic method*. Journal of Chromatography-Biomedical Applications, **1991** 567(1): p. 175-183.
68. Aurora-Prado, M.S., Steppe, M., Tavares, M.F., Kedor-Hackmann, E.R., Santoro, M.I., *Comparison between capillary electrophoresis and liquid chromatography for the determination of diclofenac sodium in a pharmaceutical tablet*. Journal of Aoac International, **2002** 85(2): p. 333-340.

69. Solangi, A., Memon, S., Mallah, A., Memon, N., Khuhawar, M.Y., Bhanger, M.I., *Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, **2013** 24(4): p. 539-544.
70. Solangi, A., Memon, S., Mallah, A., Memon, N., Khuhawar, M.Y., Bhanger, M.I., *Determination of ceftriaxone, ceftizoxime, paracetamol, and diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis in pharmaceutical formulations and in human blood serum*. Turkish Journal of Chemistry, **2010** 34(6): p. 921-933.
71. Jin, W.R., Zhang, J., *Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, **2000** 868(1): p. 101-107.
72. Mokhtari, A., Karimi-Malehb, H., Ensafic, A.A., Beitollahid, H., *Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2013** 169: p. 96-105.
73. Gimenes, D.T., Freitas, J.M., Munoz, R.A.A., Richter, E.M., *Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode*. Electroanalysis, **2011** 23(11): p. 2521-2525.
74. Hassan, S.S.M., Abdelaziz, R.M. and Abdelsamad, M.S., *Plastic membrane-electrode for selective determination of diclofenac (voltaren) in pharmaceutical preparations*. Analyst, **1994** 119(9): p. 1993-1996.
75. Mazurek, S., Szostak, R., *Comparison of infrared attenuated total reflection and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of diclofenac sodium in tablets*. Vibrational Spectroscopy, **2011** 57(1): p. 157-162.
76. Castillo, M.A., Bruzzone, L., *Indirect fluorometric determination of diclofenac sodium*. Analytical Sciences, **2006** 22(3): p. 431-433.

77. Damiani, P.C., Bearzotti, M., Cabezón, M.A., Olivieri, A.C., *Spectrofluorometric determination of diclofenac in tablets and ointments*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **1999** 20(3): p. 587-590.
78. Tubino, M., De souza, R.L., *Gravimetric method for the determination of diclofenac in pharmaceutical preparations*. Journal of Aoac International, **2005** 88(6): p. 1684-1687.
79. Zhang, K., Dai, L., Chetwyn N.P., *Simultaneous determination of positive and negative pharmaceutical counterions using mixed-mode chromatography coupled with charged aerosol detector*. Journal of Chromatography A, **2010** 1217(37): p. 5776-5784.
80. Lantz, M.D., Risley, D.S., Peterson, J.A., *Simultaneous resolution and detection of a drug substance, impurities, and counter ion using a mixed-mode HPLC column with evaporative light scattering detection*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1997** 20(9): p. 1409-1422.
81. Munjal, I.D., Minna, J.D., Manneckjee, R., Bieck, P., Spector, S., *Possible role of endogenous morphine and codeine on growth-regulation of lung-tissue*. Life Sciences, **1995** 57(5): p. 517-521.
82. http://pt.wikipedia.org/wiki/Code%C3%ADna#cite_note-Tratamento-2,
acessado às 10:30h de 05/03/**2013** .
83. Williams, D.G., Hatch, D.J., Howard, R.F., *Codeine phosphate in paediatric medicine*. British Journal of Anaesthesia, **2001** 86(3): p. 413-421.
84. Jiménez-Andrade, J.M., Ortiz, M.I., Pérez-Urizar, J., Aguirre-Bañuelos, P., Granados-Soto, V., Castañeda-Hernández, G., *Synergistic effects between codeine and diclofenac after local, spinal and systemic administration*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, **2003** 76(34): p. 463-471.
85. Asomoza-Espinosa, R., Alonso-López, R., Mixcoatl-Zecuatl, T., Aguirre-Bañuelos, P., Torres-López, J.E., Granados-Soto, V., *Sildenafil increases*

- diclofenac antinociception in the formalin test*. European Journal of Pharmacology, **2001** 418(3): p. 195-200.
86. Mixcoatl-Zecuatl, T., Aguirre-Banuelos, P., Granados-Soto, V., *Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test*. European Journal of Pharmacology, **2000** 400(1): p. 81-87.
 87. Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., *Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, st-91, u50488h, and l-pia on the formalin test and an isobolographic analysis of the nsaid interaction*. Anesthesiology, **1993** 79(2): p. 270-281.
 88. Raffa, R.B., Stone, D.J., Tallarida, R.J., *Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol)*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **2000** 295(1): p. 291-294.
 89. Raffa, R.B., Tallarida, R.J., *Synergistic combination therapy from animal models*, in *Management of Acute and Chronic Pain: The Use of the Tools of the Trade*. **2000** p. 71-75.
 90. Aguirre-Bañuelos, P., Granados-Soto, V., *Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, **1999** 42(2): p. 79-85.
 91. Fletcher, D., Benoist, J. M., Gautron, M., Guilbaud, G., *Isobolographic analysis of interactions between intravenous morphine, propacetamol and diclofenac in carrageenin-injected rats*. Anesthesiology, **1997** 87(2): p. 317-326.
 92. Yang, X., Feng, J., Chen, Z., Liao, R., Li, X., *Determination of Six Analgesics by CE with an Improved Electromagnetic Induction Detector*. Chromatographia, **2012** 75(1-2): p. 71-76.
 93. Yang, C., Ding, L., Liu, W., Zhang, Z., *Determination of diclofenac sodium and codeine phosphate in shuerfen tablets by CPA-matrix method*. Spectroscopy and Spectral Analysis, **1999** 19(2): p. 236-237.

94. Vazquez-Roig, P., Segarra, R., Blasco, C., Andreu, V., Picó, Y., *Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, **2010** 1217(16): p. 2471-2483.
95. Francisco, K.J.M., do Lago, C.L., *A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector*. Electrophoresis, **2009** 30(19): p. 3458-3464.
96. Deconinck, E., Sacré, P.Y., Baudewyns, S., Courselle, P., De Beer, J., *A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl salicylic acid and/or antihistaminics*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2011** 56(2): p. 200-209.
97. Jaroš, M., Soga, T., van de Goor, T., Gas, B., *Conductivity detection in capillary zone electrophoresis: Inspection by PeakMaster*. ELECTROPHORESIS, **2005** 26(10): p. 1948-1953.
98. Buchberger, W., Haddad, P.R., *Effects of carrier electrolyte-composition on separation selectivity in capillary zone electrophoresis of low-molecular-mass anions*. Journal of Chromatography, **1992** 608(1-2): p. 59-64.
99. Eriksson, J., Svanfelt, J., Kronberg, L., *A Photochemical Study of Diclofenac and Its Major Transformation Products*. Photochemistry and Photobiology, **2010** 86(3): p. 528-532.

7 - Trabalhos desenvolvidos no período

Artigos publicados no período

1. Tormin, T. F.; Cunha, R. R.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A.; *Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection*. Talanta (Oxford), v. 99, p. 527-531, 2012.
2. Gimenes, D. T.; Pereira, P. F.; Cunha, R. R.; da Silva, R. A. B.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M.; *A Simple Strategy to Improve the Accuracy of the Injection Step in Batch Injection Analysis Systems with Amperometric Detection*. Electroanalysis (New York, N.Y.), v. 24, p. 1805-1810, 2012.
3. Cunha, R. R.; Tormin, T. F.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A.; *Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica*. Química Nova (Impresso), 2013 (aceito para publicação).
4. Miranda, J. A. T.; Cunha, R. R.; Gimenes, D. T.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M.; *Determinação simultânea de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico usando análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pulsada*. Química Nova (Impresso), v. 35, p. 1459-1463, 2012.
5. Silva, R. B. A.; Cunha, R. R.; Silva, A. T. C.; Oliveira, A. L. B.; Espindola, F. S.; Munoz, R. A. A.; Richter, E. M.; *Development of a Simple and Fast Electrochemical Method to Evaluate Physical Stress in Athletes*. Electroanalysis (New York, N.Y.), v. 23, p. 2601-2606, 2011.
6. Cunha, R. R.; Munoz, R. A. A.; do Lago, C. L.; Richter, E. M.; *Simultaneous determination of diclofenac and its common counter-ions in less than 1 minute using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*. Electrophoresis (artigo submetido para publicação).

Artigo em redação

Cunha, R. R.; Ribeiro, M. A. C.; Munoz R. A. A.; do Lago C. L.; Richter E. M.,
*Rapid and simultaneous determination of diclofenac and codeine using
capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (CE-C⁴D).* (artigo
em redação).