

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

**“Aplicação da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem
contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas
contendo aspirina ou dipirona em combinação com outros princípios
ativos”**

MARIANA CARDOSO MARRA

Dissertação de Mestrado

Orientador

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

Uberlândia

Fevereiro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

**“Aplicação da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem
contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas
contendo aspirina ou dipirona em combinação com outros princípios
ativos”**

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: Mariana Cardoso Marra

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia

Fevereiro de 2014



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 184/PPQUI.

DATA: 18/02/2014

DISCENTE: Mariana Cardoso Marra

MATRÍCULA: 11212QMI011

TÍTULO DO TRABALHO: Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo dipirona ou aspirina em combinação com outros princípios ativos.

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 treze horas e trinta minutos do dia dezoito de fevereiro do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Evandro Piccin, da Universidade Federal de Belo Horizonte, Anizio Marcio de Faria, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal/UFU e Eduardo Mathias Richter, do Instituto de Química da UFU, 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 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) 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 a provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Ingeniería

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 ____ dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às ____ horas e ____ minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Evandro Piccin
UFMG

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria
FACIP/UFU

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

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

+55 - 34 - 3239-4385

cpqquimica@ufu.br

<http://www.cpqquimica.iq.ufu.br>

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

AGRADECIMENTOS

- *A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e me mostrar o caminho nas horas incertas.*
- *A toda minha Família Marra, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Em especial, Papai Donizete, Mamãe Nilza, mana Marielle e mano Fabiano, muito obrigada por acreditarem em mim! Vocês são os melhores!*
- *Ao Tiago, pelo companheirismo, paciência, motivação, compreensão e principalmente por deixar os meus dias mais felizes.*
- *Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e ser meu exemplo de profissional. Muito obrigada pelo suporte, por cada ideia e pelo incentivo durante a realização deste trabalho.*
- *Ao prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, por todas as contribuições em meu aprendizado durante o mestrado e ao apoio dado na realização deste trabalho.*
- *Ao prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago, ao Dr. Denis Tadeu Rajh Vidal e aos demais colaboradores do IQ-USP pela contribuição no trabalho e por concederem a aparelhagem e espaço físico.*
- *Ao meu grande amigo e companheiro de trabalho, Rafael (Pisqua), pela imensa contribuição na realização deste trabalho. Obrigada pela paciência e por estar ao meu lado nas horas que mais precisei!*
- *Aos demais amigos do NUPE, Polyana (pops_gatinha), Denise, Rodrigo (Banana), Polyana (poly_luiza), Daly, David (Marruco), Thiago (Tormin), Gracy, Poliana, Luiz André, Laiz, Monike, Michelle, Ana Paula, Jéssica, Renata, Rafael (Melo), Weberson,*

Fernanda, Alexandre, Dudu, Helieder e Rodrigo Franco. Agradeço a cada um de vocês pela colaboração nos trabalhos, pela amizade verdadeira e por me fazer rir até nos dias mais estressantes (rsrs). Foram vocês que tornaram as minhas horas de trabalho mais descontraídas. Melhores companheiros de trabalho não há.

- Aos amigos que estão sempre presentes em minha vida: Thatá e Rafa, Nati e Tande, Dani e Weidy, Nanda e Buneca, Cunhado e Ceci, Nádhia e Andrey, Pâmela, Talitha, Flor, Fran, Aninha, Bruno (Boizão), Mel, Sângela, Fernandinha, integrantes do grupo #ZueiraNeverEnds e aos demais que estão na memória. Muito obrigada pelas palavras de força, incentivo e pelos momentos de alegria. Desejo toda felicidade do mundo a vocês. Saibam que têm a minha confiança e que Deus eternize nossas amizades.

- Às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelas bolsas de Iniciação Científica e de Mestrado, pelo apoio financeiro nos projetos e congressos.

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

- Aos membros da banca, por aceitarem o convite e, assim, contribuírem para o aprimoramento deste trabalho.

Sumário

Resumo.....	i
Abstract	iii
Lista de figuras	v
Lista de tabelas	x
Lista de abreviações	xi
Lista de símbolos.....	xiv
1 Introdução	1
1.1 Breve introdução à eletroforese capilar	1
1.2 Migração das espécies em eletroforese capilar.....	4
1.3 O fluxo eletrosmótico e sua importância em CE.....	5
1.4 Modalidade de separações eletroforéticas	12
1.4.1 Eletroforese capilar de zona (CZE)	13
1.4.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)	13
1.4.3 Eletroforese capilar em gel (CGE)	13
1.4.4 Eletrocromatografia capilar (CEC).....	14
1.4.5 Isotacoforese capilar (CITP).....	14
1.4.6 Focalização isoeletrica capilar (CIEF).....	14

1.5 Sistemas de detecção	15
1.5.1 Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C ⁴ D). 18	
1.5.2 Detecção por espectrometria de massas (MS)	20
1.6 Determinação simultânea de cátions e ânions por CE-C ⁴ D.....	21
1.7 Análises rápidas por CE usando capilares de dimensão reduzida	23
1.8 Ácido acetilsalicílico e ácido salicílico	24
1.9 Dipirona.....	27
1.10 Dipirona e ácido acetilsalicílico na presença de outros princípios ativos	28
2 Objetivos	35
3 Parte Experimental	36
3.1 Reagentes e amostras	36
3.2 Instrumentação	37
4 Resultados e discussões.....	41
4.1 Metodologia para determinação rápida e simultânea de ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, cafeína e dipirona em formulações farmacêuticas	41
4.1.1 Conclusões parciais	61
4.2 Metodologia para determinação rápida de dipirona em combinação com outros princípios ativos	62
4.2.1 Conclusões parciais	81
5 Conclusões gerais e perspectivas futuras	82
6 Referências bibliográficas	84
7 Trabalhos desenvolvidos no período.....	101

RESUMO

Neste trabalho, a técnica de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D) foi utilizada no desenvolvimento de métodos rápidos de controle de qualidade de medicamentos. O tampão de corrida (BGE) composto por 20 mmol L⁻¹ de 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3diol (TRIS) e 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,4-dimetoxicinâmico (DMX), pH 8,4; foi usado na análise de duas formulações farmacêuticas contendo: (a) dipirona (DIP) + cafeína (CAF); (b) ácido acetilsalicílico (AAS) + CAF. Outro BGE, composto por 12 mmol L⁻¹ de trietanolamina (TEA) e 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH 8,5) foi usado na análise de amostras farmacêuticas contendo: (a) DIP + escopolamina (ESC); (b) DIP + CAF + orfenadrina (ORF); (c) DIP + CAF + mepiramina (MEP) + ácido ascórbico (AA). Todos os métodos de análise propostos são rápidos, com tempo de duração igual ou inferior a 1 minuto. Adicionalmente, os produtos de degradação da DIP (metilamina) e AAS (ácido salicílico) também foram detectados. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) foi utilizada para confirmar a formação da metilamina (composto detectado de forma inédita). Na determinação de CAF, DIP, AAS e AS, os DPR (n = 10) calculados foram inferiores a 6%, 0,6% e 6%, para área dos picos, tempos de migração e resolução, respectivamente. Na determinação de DIP, CAF, ESC, ORF, MEP e AA, os DPR (n = 10) calculados foram inferiores a 4%, 2% e 5%, para área dos picos, tempos de migração e resolução, respectivamente. As curvas de calibração para todas as espécies quantificadas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,993. Os resultados obtidos com o método proposto na análise de formulações farmacêuticas comerciais, contendo CAF + AAS ou CAF + DIP, foram comparados aos obtidos por HPLC. 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 HPLC. Além disso, o método proposto também apresentou resultados satisfatórios nos estudo de adição e recuperação (entre 92% e 103%) nas amostras contendo DIP e os demais princípios ativos (CAF, ESC, MEP, ORF e AA).

Palavras chave: Dipirona, cafeína, aspirina, ácido salicílico, escopolamina, orfenadrina, mepiramina, ácido ascórbico, produtos de hidrólise, eletroforese capilar, detecção condutométrica sem contato, espectrometria de massas.

ABSTRACT

In the present work capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection (CE-C⁴D) was used for the development of fast methods for quality control of medicines. The background electrolyte (BGE) composed of 20 mmol L⁻¹ 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol (TRIS) and 10 mmol L⁻¹ 3,4-dimethoxycinnamic acid (DMX), pH 8.4, was used for the analysis of two pharmaceutical formulations containing: (a) dipyrone (DIP) + caffeine (CAF); (b) acetylsalicylic acid (AAS) + CAF. Another BGE composed of 12 mmol L⁻¹ triethanolamine (TEA) and 10 mmol L⁻¹ DMX (pH 8.5) was used for the analysis of pharmaceuticals samples containing: (a) DIP + scopolamine (ESC); (b) DIP + CAF + orphenadrine (ORF); (c) DIP + CAF + mepyramine (MEP) + ascorbic acid (AA). All proposed analytical methods are fast, with duration equal to or less than 1 minute. In addition, the degradation products from DIP (methylamine) and AAS (salicylic acid) were also detected. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS) was used in order to confirm the formation of methylamine (compound detected for the first time). In the determination of CAF, DIP, AAS, and AS, the RSDs (n = 10) calculated were less than 6%, 0.6% and 6%, for peak area, migration time and resolution, respectively. In the determination of DIP, CAF, ESC, ORF, MEP, and AA, the SDR (n = 10) calculated were less than 4%, 2% and 5%, for peak area, migration time and resolution, respectively. The calibration curves for all quantified species presented correlation coefficients above 0.993. The results obtained with the proposed method for analysis of commercial pharmaceutical samples containing CAF + AAS or CAF + DIP were compared with those obtained by HPLC. The calculated t-values (paired t-Student test), with confidence level of 95%, were smaller than the critical value (2.78, n = 3) in all the analyses, which indicates that there were no significant

differences between the results found with the proposed method and HPLC. In addition, the proposed method presented satisfactory results in the recovery test (92% to 103%) for samples containing DIP and the other active ingredients (CAF, ESC, MEP, ORF e AA).

Keywords: dipyrone, caffeine, aspirin, salicylic acid, scopolamine, orfenadrine, mepyramine, ascorbic acid, hydrolysis products, capillary electrophoresis, contactless capacitive coupled conductivity detection, mass spectrometry

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 2 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.

Figura 3 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido.

Figura 4 – Perfil de fluxo gerado por pressão (a), típico da técnica HPLC e fluxo gerado pelo EOF (b), típico na técnica de CE, e suas correspondentes zonas de amostras.

Figura 5 – Esquema do sistema de detecção C⁴D. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.

Figura 6 – Distribuição do AAS em solução aquosa em função do pH.

Figura 7 – Distribuição do AS em solução aquosa em função do pH.

Figura 8 – Distribuição do DIP em solução aquosa em função do pH.

Figura 9 – Distribuição do CAF em solução aquosa em função do pH.

Figura 10 – Distribuição do ESC em solução aquosa em função do pH.

Figura 11 – Distribuição do ORF em solução aquosa em função do pH.

Figura 12 – Distribuição do MEP em solução aquosa em função do pH.

Figura 13 – Distribuição do AA em solução aquosa em função do pH.

Figura 14 – Imagem do equipamento de CE-C⁴D usado na realização dos experimentos.

Figura 15 – Esquema do sistema CE-C⁴D usado nesse trabalho.

Figura 16 – Eletroferogramas obtidos em função da variação na composição do BGE (pH 8,4) contendo respectivamente DMX (30 ou 20 ou 10 mmol L⁻¹) ajustado com TRIS. Solução padrão injetada: CAF, DIP, AAS e AS (2 mmol L⁻¹ de cada).

Figura 17 – Eletroferogramas obtidos pela injeção de solução padrão contendo CAF, DIP, AAS e AS (2 mmol L⁻¹ de cada) preparada em água ou em solução tampão.

Figura 18 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de: (A) solução padrão contendo CAF, DIP, AAS (2 mmol L⁻¹ de cada) e AS (1 mmol L⁻¹), e soluções preparadas a partir de amostras comerciais contendo (B) CAF e AAS, e (C) CAF e DIP.

Figura 19 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo CAF, DIP e AAS (2 mmol L⁻¹ cada) e AS (1 mmol L⁻¹).

Figura 20 – Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo CAF, DIP e AAS (2 mmol L⁻¹ de cada), AS (1 mmol L⁻¹) e lítio como IS (0,7 mmol L⁻¹).

Figura 21 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF, DIP e AAS (0,2 – 6 mmol L⁻¹) e AS (0,1 – 3 mmol L⁻¹) com coeficientes de correlação de 0,995; 0,994; 0,992 e 0,991 para CAF, DIP, AAS e AS, respectivamente.

Figura 22 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF, DIP e AAS (0,5 – 4 mmol L⁻¹) e AS (0,25 – 2 mmol L⁻¹) e as suas respectivas curvas de calibração.

Figura 23 – Eletroferogramas obtidos na injeção de soluções padrão contendo 3 mmol L⁻¹ de AAS (A) ou NaDIP (B) antes (a) e depois da exposição à luz solar por 30 min (b), 60 min (c), and 180 min (d).

Figura 24 – Eletroferogramas obtidos por CE-MS no modo de monitoramento de íons selecionados antes (A e B) e depois (C and D) da exposição à luz solar. m/z 312 (DIP); m/z 218 (4-MAA); m/z 32 (metilamina); m/z 111 (hidroximetanosulfonato).

Figura 25 – Eletroferogramas obtidos na injeção de soluções amostras contendo NaDIP antes (a) e depois (b) da exposição à luz solar por 180 min.

Figura 26 – Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em função das concentrações do BGE composto por DMX (10 e 20 mmol L^{-1}) com pH acertado em 8,5 com adição de TEA.

Figura 27 – Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em função das concentrações do BGE composto por DMX (10 e 20 mmol L^{-1}) com pH acertado em 8,5 com adição de TEA.

Figura 28 - Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) e AA (2 mmol L^{-1}) em função das concentrações do BGE composto por DMX (10 e 20 mmol L^{-1}) com pH acertado em 8,5 com adição de TEA.

Figura 29 – Eletroferogramas obtidos por soluções padrões contendo (A) ESC ($0,50 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$); (B) ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada); (C) MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada), and AA ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Eletroferogramas para soluções amostras com composição similares também são apresentados.

Figura 30 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25 kV).

Figura 31 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25 kV).

Figura 32 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) e AA (2 mmol L^{-1}) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25 kV).

Figura 33 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$).

Figura 34 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada).

Figura 35 - Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) e AA (2 mmol L^{-1}).

Figura 36 – Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções padrões contendo (A) ESC + DIP ($0,75$ e $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), (B) ORF + CAF + DIP ($0,75$, $1,50$, e $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), e (C) MEP, CAF, DIP + AA ($0,75$, $1,50$, $1,50$, and $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente).

Figura 37 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de soluções padrões contendo concentrações crescentes de (A) ESC ($0,05 - 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,1 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1}$); (B) ORF ($0,05 - 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, e DIP ($0,1 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1}$); (C) MEP ($0,05 - 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, DIP ($0,1 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1}$), and AA ($0,25 - 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$).

Figura 38 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ESC ($0,1 - 5 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,5 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração.

Figura 39 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ORF ($0,25 - 1,25 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($0,5 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração.

Figura 40 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de MEP ($0,25 - 1,25 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($0,5 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), AA ($1,0 - 3,0 \text{ mmol L}^{-1}$), e suas respectivas curvas de calibração.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Faixa típica de LOD de sistemas de detecção em CE.

Tabela 2 - Características analíticas do método proposto.

Tabela 3 - Comparação entre os resultados obtidos pela determinação simultânea de DIP, CAF e AAS usando CE-C⁴D e HPLC (n = 3).

Tabela 4 – Precisões intra-dia (média \pm SD; n = 10) e inter-dia (média \pm SD; n = 3) dos métodos propostos.

Tabela 5 - Características analíticas do método proposto.

Tabela 6 – Concentração dos analitos em três amostras farmacêuticas e seus respectivos valores de recuperação por CE-C⁴D (n = 3).

Tabela 7 – Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (n = 3).

LISTA DE ABREVIACÕES

AA – Ácido ascórbico

AAS – Ácido acetilsalicílico

AINE - Antiinflamatório não-esteróide

AS – Ácido salicílico

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

CAF – Cafeína

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

CEC – Eletrocromatografia Capilar (do inglês, “*Capillary Electrochromatography*”)

CGE – Eletroforese Capilar em Gel (do inglês, “*Capillary Gel Electrophoresis*”)

CIEF – Focalização Isoelétrica Capilar (do inglês, “*Capillary Isoelectric Focusing*”)

CITP – Isotacoforese Capilar (do inglês, “*Capillary Isotachophoresis*”)

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio

CZE - Eletroforese Capilar de Zona (do inglês “*Capillary zone electrophoresis*”)

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

DCE – Dupla Camada Elétrica

DIP – Dipirona

DMX – Ácido 3,4-Dimetoxicinâmico

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

ESC – Escopolamina

ESI – Ionização por Electrospray (do inglês, “*Electrospray Ionization*”)

FSCE – Eletroforese Capilar em Solução Livre (do inglês, “*Free Solution Capillary Electrophoresis*”)

GC – Cromatografia Gasosa (do inglês, “*Gas Chromatography*”)

HMS – Hidroximetilsulfonato

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, “*High-performance Liquid Chromatography*”)

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

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

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

MAA – Metilaminoantipirina

MEKC – Cromatografia Eletrocinética Micelar (do inglês, “*Micellar Electrokinetic Chromatography*”)

MEP – Mepiramina

MS – Espectrometria de Massas (do inglês, “*Mass Spectrometry*”)

NaDIP – Dipirona sódica

ORF – Orfenadrina

pI – Potencial Isoelétrico

RF – Rádio Frequência

RSD – Desvio Padrão Relativo (do inglês, “*Relative Standard Deviation*”)

SD – Desvio Padrão (do inglês, “*Standard Deviation*”)

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

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

TEA – Trietanolamina

TRIS – 2-Amino-2-hidroximetil-1,3diol

LISTA DE SÍMBOLOS

E – Campo Elétrico

q – Carga

ε – Constante Dielétrica

α – Grau de Dissociação

μ_{ep} – Mobilidade Eletroforética

μ_{ef} – Mobilidade Eletroforética Efetiva

μ_{eo} – Mobilidade Eletrosmótica

n – Número de Espécies

ζ – Potencial Zeta

r – Raio do íon

T - Temperatura

v_a – Velocidade Aparente

v_{ep} – Velocidade Eletroforética

v_{ef} – Velocidade Eletroforética Efetiva

v_{eo} – Velocidade Eletrosmótica

η – Viscosidade

1- Introdução

1.1- Breve introdução à eletroforese capilar

Há várias décadas, notou-se que a diferença na velocidade de migração entre diferentes substâncias poderia ser utilizada na separação e quantificação das mesmas. A técnica de separação baseada na migração diferenciada de moléculas ou espécies carregadas quando estas estão submetidas a um campo elétrico é denominada de eletroforese [1]. Esta técnica foi desenvolvida pelo químico Arne Wilhelm Karsin Tiselius em 1930 [2]. Neste trabalho, foram separadas misturas de proteínas que compõe o soro sanguíneo em tubos preenchidos com solução tampão, sob o efeito de um campo elétrico. Tiselius verificou que os componentes da amostra migraram com direção e velocidade definidas por suas cargas e massas [3].

A maior limitação encontrada nos experimentos realizados por eletroforese é a falta de habilidade para dissipar o calor (Efeito Joule), tendo como consequência o aquecimento da solução, que acentua de forma comprometidora a difusão das espécies. O calor é dissipado somente pelas extremidades do recipiente gerando gradientes de temperatura que induzem gradientes de densidades causando convecção [3]. O aquecimento do meio também possibilitava a degradação térmica do material biológico. Assim, 30 anos depois, de modo a minimizar os efeitos indesejáveis causadas pelo Efeito Joule, Hjérten introduziu uma alternativa para a técnica [4]. Ele demonstrou a possibilidade de conduzir separações eletroforéticas, nas quais os componentes da amostra eram separados em um tubo de quartzo sob rotação. Tais tubos não eram como os capilares de hoje (d.i. < 100 μm), pois os diâmetros internos eram da ordem de milímetros. Posteriormente, Hejérten ainda iria contribuir significativamente para o desenvolvimento da técnica com a adaptação da eletroforese em gel para tubos capilares

[5]. Logo se percebeu a vantagem da utilização de tubos de reduzido diâmetro interno, pois a geometria do capilar (alta relação entre a área de contato e o volume interno do capilar) favorece a dissipação de calor.

Apenas em meados dos anos 80, a eletroforese começaria a demonstrar indícios de uma técnica de separação de alta eficiência. Nesses anos foram realizados importantes estudos que levaram ao aprimoramento da instrumentação e ao desenvolvimento da teoria relacionada a essa técnica. Em 1979, na Holanda, Mikkers *et al.* enunciaram estudos teóricos sobre o comportamento dos analitos em eletroforese por zona livre (CZE) [6]. Os resultados obtidos motivaram o grupo a desenvolver estudos práticos [7] utilizando um equipamento de eletroforese desenvolvido por Everaerts *et al.* [8] que utilizava um tubo de teflon com 0,2 mm de diâmetro interno e 0,35 mm de diâmetro externo. Neste trabalho, conseguiu-se a separação de uma mistura de 16 ânions, com altura de pratos de 10 μm , em aproximadamente 10 min.

Durante o começo da década de 80, nos Estados Unidos, Jorgenson e Lukcas, apresentaram pela primeira vez a Eletroforese Capilar (CE) [9, 10]. Nesse trabalho destacaram-se o desenvolvimento de equações analíticas, discussões sobre efeitos que influenciam a dispersão de bandas e possibilidade de obtenção de separações de alta eficiência sob ação de um elevado campo elétrico, em uma coluna capilar de sílica fundida com 75 μm de diâmetro interno. Com isso, conseguiu-se altíssima eficiência e ótima resolução na separação de aminoácidos e proteínas. Eles cruzaram uma espécie de marco que separa a eletroforese descrita até o momento da CE e, por isso, são considerados os pais da CE.

A partir de 1983 houve um crescimento do número de artigos publicados envolvendo aspectos instrumentais e aplicações da CE. Relevantes também foram as

contribuições de Terabe *et al.* [11], que, em 1984, introduziram a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), que possibilitou a separação de compostos neutros por CE.

A partir daí, o que se seguiu, foram contribuições no sentido de implementação instrumental da técnica e aplicações aos mais variados tipos de substâncias e matrizes, despertando o interesse de vários grupos de pesquisa no mundo todo, elevando sua aplicabilidade a níveis jamais vistos, e, em 1987, foi lançado o primeiro equipamento comercial de CE. Por ter uma instrumentação relativamente simples, vários grupos também idealizaram e construíram seus próprios equipamentos [12].

O projeto Genoma, concluído em 1999, teve como meta obter a sequência completa do DNA humano e para isso foi necessário distinguir os diversos polinucleotídeos com massas molares por volta de 200 a 500 Daltons. Devido a sua alta capacidade de separação, somente a CE teria resolução suficiente para este tipo de separação. Além disso, devido às altas velocidades de análises obtidas em CE, foi possível que milhares de nucleotídeos fossem sequenciados em um único dia [13].

Nos últimos anos, a CE tem conquistado a atenção da comunidade científica, como sendo uma importante técnica alternativa a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a separação e análise de compostos de interesse industrial, farmacêutico, clínico e ambiental, ao lado da cromatografia gasosa (GC) [14]. Além da simplicidade, outras vantagens apresentadas por CE são:

- Rapidez nas análises;
- Versatilidade, já que uma única coluna capilar pode ser utilizada para a separação de classes de compostos completamente diferentes, sendo necessária apenas a adequação da solução tampão utilizada nas corridas;

- Baixo custo, não só pelo equipamento, mas por utilizar baixos volumes de reagentes, particularmente quando comparado com a HPLC;
- Pequeno volume de amostra exigido e com isso menor geração de resíduos;
- Possibilidade de automação;
- Geralmente não é necessário um pré-tratamento da amostra.

Entretanto, esta técnica oferece algumas limitações, pois não é adequada para a determinação de compostos voláteis, não polares e de massa molar baixa, os quais são melhores determinados por GC. Também não é muito adequada para a análise de polímeros não iônicos de massa molar alta e não é tão sensível quanto a HPLC, não sendo capaz de determinar espécies em níveis de traços [15].

1.2-Migração das espécies em eletroforese capilar

A eletroforese é um método de separação no qual as espécies de interesse estão sobre a influência de um elevado campo elétrico (E). Este campo elétrico provoca diferenças de mobilidade entre as espécies iônicas e/ou ionizáveis em meios aquosos ou mesmo orgânicos [16]. A migração das espécies carregadas eletricamente se dá devido ao conceito de mobilidade eletroforética (μ_{ep}), a qual é diretamente proporcional à carga (q) e inversamente proporcional a fatores de atrito, que estão relacionadas ao tamanho, ao raio do íon (r) e à viscosidade do meio (η) [17, 18].

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad \text{Equação 1}$$

As espécies envolvidas na análise por CE podem participar de reações de equilíbrio em função de algumas condições de análise, como pH, viscosidade ou composição de solventes e adição de agentes complexantes, podendo ter uma variação

significativa em sua carga e mobilidade. Sob a condição de equilíbrio, estas espécies, parte sem cargas e outra parte ionizadas, movimentam-se como uma única banda, e, portanto, a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) dependerá das mobilidades eletroforéticas (μ) e dos graus de dissociação (α) das n espécies individuais provenientes de ácidos ou bases fracas [18, 19].

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \times \mu_j \quad \text{Equação 2}$$

Durante uma separação, ao se estabelecer um potencial elétrico, os íons adquirem velocidades chamadas de velocidade eletroforética (v_{ep}), e esta depende de algumas propriedades da solução, como a viscosidade do meio, além das características próprias dos analitos, como a relação entre o raio iônico hidratado e a carga. A velocidade eletroforética efetiva (v_{ef}) é dependente da mobilidade eletroforética do íon (μ_{ef}) e do campo elétrico (E) ao qual o íon é submetido durante a separação:

$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \quad \text{Equação 3}$$

Os conceitos de μ_{ef} e v_{ef} são muito importantes nas análises em CE, pois se for feita uma escolha adequada do pH ou do agente complexante, espécies com mobilidades semelhantes presentes em uma mistura podem ser eficientemente separadas.

1.3 - O fluxo eletrosmótico e sua importância em CE

Durante a aplicação de um elevado campo elétrico, uma corrente é gerada no interior do capilar promovendo o movimento dos analitos em direção aos eletrodos de carga oposta. Nas separações em CE, ocorre um fenômeno de dupla camada elétrica [20], gerando o fluxo eletrosmótico (EOF) [21]. A formação desta dupla camada elétrica

é devida a adsorção de moléculas ou íons carregados na superfície ionizada do material. O EOF é um fenômeno eletroforético capaz de provocar um fluxo de solução dentro da coluna capilar e até mesmo substâncias neutras, que não são atraídas pelos pólos, podem ser deslocadas em direção ao detector [3].

A grandeza do EOF, ou seja, sua mobilidade (μ_{eo}) é dependente de fatores como a constante dielétrica (ϵ), a viscosidade (η) da solução e o potencial definido no plano de cisalhamento na região difusa, ou seja, o potencial zeta (ζ) [18, 19]:

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \times E}{4\pi\eta} \quad \text{Equação 4}$$

Quando aplicado o campo elétrico, o EOF adquire uma velocidade proporcional ao campo:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E \quad \text{Equação 5}$$

onde μ_{eo} pode ser considerada a constante de proporcionalidade [3].

Devido à presença do EOF, a velocidade que as espécies adquirem durante a análise é resultante da soma vetorial da velocidade efetiva e da velocidade eletrosmótica, denominada de velocidade aparente (v_a).

$$v_a = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \quad \text{Equação 6}$$

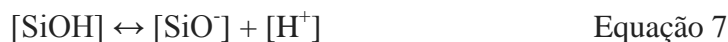
A equação 5 ainda pode ser descrita como:

$$v_a = v_{ef} \pm v_{eo} \quad \text{Equação 6.1}$$

Se os analitos de interesse tiverem mobilidades no mesmo sentido da mobilidade do EOF, o tempo de análise em CE poderá ser significativamente reduzido. Dependendo da grandeza e sentido do EOF, o analito pode reverter o seu sentido de

migração devido à força exercida pelo fluxo, ficando claro que a migração das espécies em CE não depende apenas das próprias mobilidades, mas também da mobilidade do EOF. O EOF também permite que moléculas neutras se movam no interior da coluna capilar e, desta forma, tais moléculas passam a ter a mesma mobilidade e sentido do EOF.

Dentre os vários tipos de capilares usados em CE, como sílica fundida, vidro, teflon, pyrex, etc, o capilar de sílica fundida é atualmente o mais popular [22], pois permite o emprego de uma alta tensão por ser um material dielétrico e possuir um recobrimento de poliimida que lhe proporciona uma melhor resistência mecânica. O interior do capilar de sílica contém grupos silanóis (SiOH), os quais se ionizam e, assim, se comportam como ácidos fracos de Lewis [23].



A Figura 1 mostra o efeito do pH sobre a mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais. Dependendo do pH do eletrólito de corrida, os grupos silanóis apresentam um determinado grau de ionização e vão se desprotonando a medida em que se tem um aumento do pH do eletrólito de corrida (BGE).

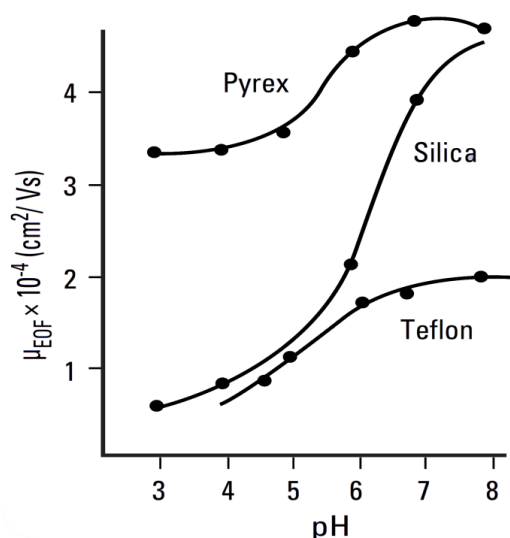


Figura 1 - Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais [24].

Observa-se que, em pH 4, a sílica começa a apresentar grupos silanóis desprotonados e, em pH 8, a ionização já é praticamente completa. Assim, com a ionização, a superfície do capilar de sílica fica carregada negativamente e uma camada de cátions do tampão se posiciona junto a parede do capilar a fim de contrabalançar o excesso de cargas negativas e, dessa forma, manter a eletroneutralidade no meio. Uma dupla camada elétrica (DCE) é então estabelecida em função da diferença de potencial gerada nesta região. Ao se aplicar um potencial elétrico longitudinal nesse sistema, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Como as cargas negativas da superfície do capilar não se movimentam, isso reduz drasticamente a velocidade de migração dos cátions eletrostaticamente ligados à essas cargas, mas por outro lado, os cátions da camada difusa, fracamente ligados, migram em direção ao cátodo. Durante a migração, devido às interações de solvatação, os íons transportam moléculas de água, induzindo a um fluxo de solução como um todo, na direção do cátodo, conhecimento como EOF normal [3, 21], como mostrado na Figura 2.

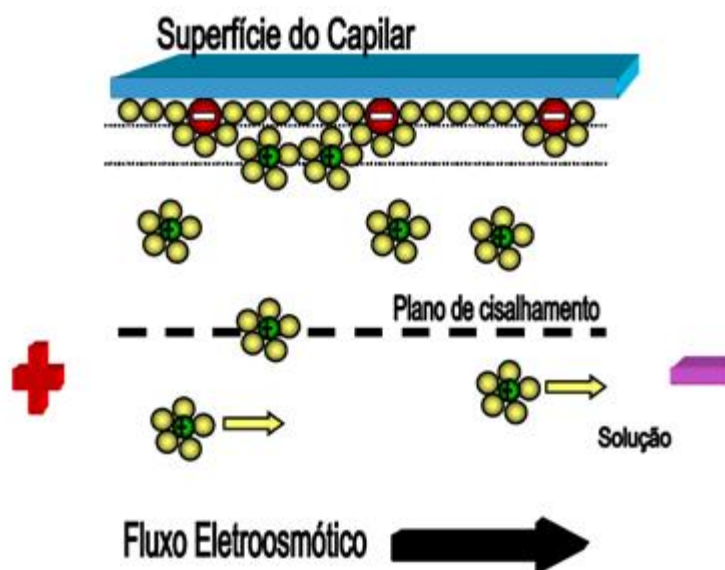


Figura 2 - Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal. Adaptada de [1, 25].

As cargas mais próximas ao capilar não migram, pois estas estão adsorvidas na superfície do capilar de sílica. Usando o EOF normal, ocorre uma migração líquida maior de cátions ($\mu_{ef} + \mu_{eo}$) em direção ao cátodo quando comparada a migração líquida de ânions ($\mu_{ef} - \mu_{eo}$) em direção ao ânodo. É de grande importância que o EOF seja constante durante a separação. Se o fluxo variar, os tempos de migração irão variar, podendo causar identificações incorretas de picos ou erros na quantificação.

Em CE, pode-se além de mudar a grandeza do EOF, mudar também a sua direção. Essa estratégia é mais comum na análise de ânions e com isso obtém-se melhor resolução e aumento da velocidade da análise, pois a velocidade eletroforética dos ânions e o EOF terão mesma direção. No entanto, a inversão pode não ser necessária quando se trata de ânions de baixa mobilidade, pois por mais que estejam sendo atraídos pelo lado oposto (ânodo), ainda assim conseguem ser “arrastados” pelo EOF e chegam ao detector, logo após as moléculas neutras.

Para promover a inversão do fluxo, o método mais utilizado emprega a adição de tensoativos catiônicos ao eletrólito de corrida, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa. A escolha adequada do tensoativo, assim como da sua concentração, permite o controle direto da magnitude do EOF. Quando o capilar sem modificação encontra-se carregado negativamente ($\text{pH} > 4$), com a 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. Nesse caso, são os ânions do tampão que passam a fazer parte da dupla camada elétrica, os quais, sob a ação do campo elétrico se movem em direção ao ânodo (pólo positivo), definindo o chamado fluxo eletrosmótico invertido (Figura 3) [26].

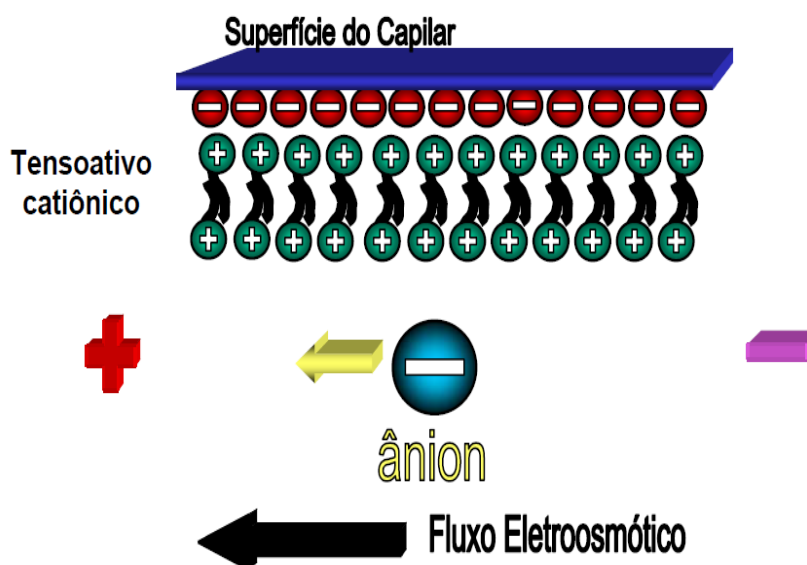


Figura 3 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico invertido. Adaptada de [1, 25].

Ao contrário do fluxo laminar ou parabólico gerado por pressão desenvolvido em HPLC, o EOF tem um perfil planar, possibilitando uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo e tornando a CE uma técnica de maior eficiência de separação quando comparada a HPLC. Nesta condição (com EOF), a análise é livre do efeito de parede

presente no fluxo laminar gerado quando se tem fluídos impulsionados por pressão através de uma tubulação em que espécies do(s) analito(s) no centro do capilar migra(m) mais rapidamente que as espécies próximas à parede do tubo (Figura 4).

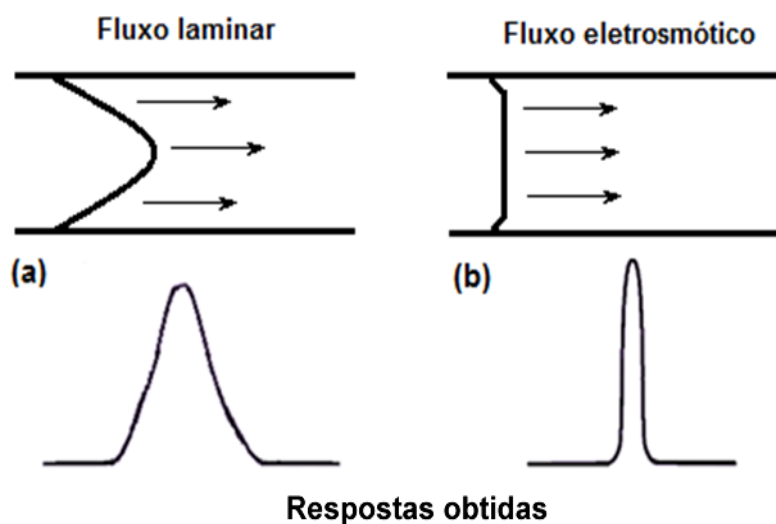


Figura 4 - Perfil de fluxo gerado por pressão (a), típico da técnica HPLC e fluxo gerado pelo EOF (b), típico na técnica de CE, e suas correspondentes zonas de amostras.

Quando desejado, alguns fatores podem ser alterados a fim de aumentar, reduzir ou suprimir o EOF. Dentre esses fatores estão:

- Campo elétrico (E): o aumento do E faz com que a v_{eo} seja elevada, o que leva a um aumento na resolução dos picos dos analitos e diminuição no tempo de análise, mas resulta em um aumento da corrente no interior do capilar, o que pode ocasionar uma má dissipação do calor [27];
- Viscosidade (η) e a temperatura (T): estes dois fatores estão relacionados entre si. Variações na temperatura ocasionam mudanças na viscosidade e o aumento da

viscosidade do meio dificulta a mobilidade dos íons na camada difusa, diminuindo a mobilidade do EOF [3];

- Modificadores orgânicos: Alteram a viscosidade do meio, podendo afetar a seletividade do sistema e diminuir o EOF [3];
- pH do BGE: Atua diretamente na ionização dos grupos silanóis e, por sua vez, no potencial zeta (ζ) [28];
- Força iônica do eletrólito: a elevação da força iônica ocasiona uma compressão da dupla camada e com isso a diminuição do EOF [1];
- Ligações covalentes: A modificação da parede interna do capilar afeta a estabilidade do sistema e pode até mesmo eliminar o EOF [1];
- Campo elétrico radial externo: controle da taxa e sentido da μ_{eof} , sendo possível a realização de alterações do EOF durante a corrida [29].

O EOF é de extrema importância nas análises por CE, se tornando ferramenta chave no desenvolvimento de métodos utilizando essa técnica.

1.4- Modalidades de separações eletroforéticas

Eletroforese é um nome genérico dado para uma série de técnicas de separação que envolvem a aplicação de um campo elétrico em um capilar preenchido com uma solução tampão. Atualmente existem várias modalidades de CE, que foram surgindo para contornar limitações das modalidades antes existentes. As variantes de CE têm demonstrado serem técnicas eficientes de separação e dentre elas estão a eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), eletroforese capilar em gel (CGE), eletrocromatografia capilar (CEC), isotacoforese capilar (CITP) e focalização isoeletrica capilar (CIEF).

1.4.1 – Eletroforese capilar de zona (CZE)

A CZE (do inglês "*capillary zone electrophoresis*"), também conhecida como eletroforese capilar em solução livre (FSCE, do inglês "*free solution capillary electrophoresis*"), é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados na prática. Nessa modalidade a separação se dá em capilar preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. Devido às suas diferenças de mobilidades, os analitos formam zonas distintas ao longo do capilar [30, 31]. Uma característica bastante atraente dessa modalidade é que, através dela, é possível fazer a determinação de cátions e ânions simultaneamente. A limitação dessa modalidade é que moléculas neutras não são separadas sem o uso de uma estratégia adicional, como por exemplo, a adição de um agente complexante ou derivatizações [32].

1.4.2 – Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A fim de fazer a determinação de espécies neutras, em 1984 foi introduzida por Terabe *et al.*, [11, 33] a MEKC (do inglês "*micellar electrokinetic chromatography*"). Nessa modalidade, agentes tensoativos iônicos são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases (BGE e micelas) e a separação das espécies neutras é possível pela sua interação com a fase micelar. Embora a MEKC tenha sido idealizada para separar espécies neutras, ela também pode auxiliar na separação de compostos iônicos [34].

1.4.3 – Eletroforese capilar em gel (CGE)

A CGE (do inglês "*capillary gel electrophoresis*") tem sido comumente usada na separação de compostos de caráter iônico e alta massa molar. Nessa modalidade, os solutos migram dentro do capilar através de uma estrutura polimérica (gel). O mecanismo de separação se baseia na restrição seletiva da passagem de moléculas de

diferentes tamanhos pela matriz polimérica. Íons menores migram mais rapidamente, enquanto que solutos maiores ficam mais tempo retidos [35].

1.4.4 – Eletrocromatografia capilar (CEC)

A CEC (do inglês "*capillary electrochromatography*") pode ser descrita como uma técnica híbrida de CE e HPLC devido à combinação dos mecanismos de separação envolvidos nas duas técnicas. Nesta técnica, os capilares são preenchidos parcialmente com uma fase estacionária e o fluxo da fase móvel não é gerado por pressurização como em HPLC, pois é forçada a eluir através do capilar por meio da aplicação de um campo elétrico. Sua principal aplicação é na separação de compostos neutros, já que envolvem interações entre os analitos e as fases estacionárias ou pseudo-estacionárias, mas compostos iônicos também podem ser analisados [36, 37].

1.4.5 – Isotacoforese (CITP)

A CITP (do inglês "*capillary isotachorphoresis*") é realizada em um sistema de tampão descontínuo. A amostra é condensada entre dois tampões diferentes, um denominado dianteiro ou líder e o outro terminador. O primeiro eletrólito apresenta mobilidade maior que todos os componentes da amostra e o segundo apresenta mobilidade menor. Quando um campo elétrico é aplicado, os componentes da amostra começam a se separar em zonas de acordo com suas mobilidades [32].

1.4.6 - Focalização isoelétrica capilar (CIEF)

A CIEF (do inglês "*capillary isoelectric focusing*") é uma modalidade de separação idealizada para a determinação de substâncias com características anfóteras, ou seja, possuem em sua estrutura grupos funcionais com caráter ácido e básico. A separação se dá de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através da aplicação de um

potencial ao longo de um gradiente de pH. Neste tipo de separação os analitos não podem ser detectados *in situ*, pois quando eles atingem o seu pI eles param de se movimentar dentro do capilar e, portanto, não chegam ao detector. Após a focalização, as zonas podem ser movidas em direção ao detector por meio de pressão [32].

1.5 – Sistemas de detecção

Em CE, tão importante quanto o sistema de separação é o sistema de detecção e, com isso, o desenvolvimento de novos sistemas de detecção tem sido uma área de intensa pesquisa [38]. Outra contribuição para a implementação de uma variedade de sistemas de detecção é a diversidade de moléculas que se beneficiam do uso de métodos eletroforéticos. A partir de um bom desempenho do sistema de detecção é possível a determinação das espécies de interesse em diferentes condições de análise mantendo-se uma boa razão sinal-ruído (SNR, do inglês “*signal-noise ratio*”) e baixos limites de detecção (LOD, do inglês “*limit of detection*”) e quantificação (LOQ, do inglês “*limit of quantitation*”).

Muitos detectores aplicados em outras técnicas de separação foram adaptados para CE. Em geral, os adotados em CE são semelhantes aos usados em HPLC. No entanto, seu acoplamento com o capilar e sua manutenção são mais trabalhosos devido ao baixo volume da cela de detecção. E isso faz com que haja a necessidade de sistemas de detecção bastante sensíveis. Os métodos de detecção usados em CE podem ser classificados de acordo com suas características em fotométricos, eletroquímicos ou acoplados. Esta última classe pode ser representada por métodos hifenados, como a espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, fotometria de chama e espectrometria de emissão por plasma. Vários critérios devem ser considerados na

escolha do método de detecção, como a seletividade de detector, linearidade na faixa de resposta desejada, precisão e exatidão do detector, robustez, LOD e LOQ [16]. Haber [19, 39]. dá uma boa visão dos LOD para diversos métodos de detecção quando aplicados à CE. A Tabela 1 apresenta alguns valores típicos de LOD para os sistemas de detecção mais utilizados em CE.

Tabela 1- Faixa típica de LOD de sistemas de detecção em CE [19, 39].

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	$10^{-4} - 10^{-9}$

Os detectores também podem ser classificados em universais ou específicos (seletivos). Os detectores seletivos respondem especificamente a certa propriedade do analito. Estes detectores são interessantes em caso de matrizes complexas, no entanto, a seletividade impede de detectar diferentes analitos em uma mesma análise.

Fotodetectores baseados na absorção na região do UV/vis, fluorescência, espalhamento Raman, amperometria e radiometria são exemplos de detectores seletivos. Os universais não apresentam seletividade e respondem a diferenças entre alguma propriedade do analito em relação ao eletrólito de corrida. O sinal adquirido não depende das propriedades específicas dos analitos e sim da diferença entre as propriedades dos analitos e eletrólito de corrida. Detectores de índice de refração e condutividade são exemplos de detectores universais. Estes detectores permitem que diferentes analitos sejam determinados em uma única análise, o que os torna relativamente atrativos, apesar de apresentarem LOD superiores aos dos métodos seletivos [3].

Quanto aos tipos de detectores, algumas observações devem ser feitas. Os sistemas de detecção ópticos, como UV-Vis, são os mais utilizados em CE. Pois selecionando um comprimento de onda adequado, o sistema poderá ser bastante seletivo para determinados analitos. A detecção também pode ser feita indiretamente adicionando ao tampão uma substância (cromóforo) que absorve em determinada região do espectro e os analitos, que não absorvem, podem ser detectados (características universais). Estes sistemas de detecção isolam eletricamente o detector do sistema de separação, porém, necessitam de sistemas mais elaborados de alinhamento. Além de apresentarem o incômodo de aberturas de janelas ópticas nos capilares de sílica por causa do revestimento de poliimida, e isto, fragiliza mecanicamente o capilar. Como outra alternativa, a fim de se obter menor LOD, alguns capilares apresentam regiões de detecção com caminho óptico dilatado ou mesmo em “Z” [40].

Os detectores baseados em fluorescência, apesar de serem sensíveis, podem necessitar constantemente de derivatizações (número restrito de espécies que fluorescem), além de ser um detector de custo mais elevado [41]. Os métodos eletroquímicos (amperométricos) são sensíveis e apresentam boa seletividade a partir da

seleção do potencial de trabalho. Porém, este tipo de detecção fica limitado a espécies eletroativas e apresentam dificuldades com relação ao posicionamento dos eletrodos no capilar, tendo como consequência perda de reprodutibilidade quando há a necessidade de substituição do capilar [42-44]. A espectrometria de massas além de ser um sistema de detecção com boa sensibilidade, traz grande informação de caráter estrutural em relação as espécies analisadas. Porém, o eletrólito deverá ter algumas características, como alta pureza e volatilidade, se ajustando a esse tipo de detecção [40, 45].

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

Devido aos problemas presentes nos sistemas de detecção eletroquímico convencional e ópticos, em 1980, Gaš *et al.* [46] propuseram um sistema de detecção baseado na aplicação de sinais de rádio frequência (RF), no qual o sinal obtido respondia à passagem de espécies iônicas pela coluna capilar. O objetivo era o desenvolvimento de um detector condutométrico sem contato de alta frequência dedicado à isotacoforese, mas seu sistema foi inviabilizado às técnicas capilares pela grande dimensão do arranjo proposto e perda de reprodutibilidade com o desalinhamento dos eletrodos.

Em 1998, Zemann e colaboradores [47] e Fracassi da Silva e do Lago [48] descreveram, simultaneamente e independentemente a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D , do inglês *capacitively coupled contactless conductometry detection*). Neste tipo de detecção, ao contrário da detecção condutométrica convencional (com contato), a instalação dos eletrodos é feita na parte externa do capilar, não necessitando de estratégias como a perfuração do capilar com um laser de CO_2 [49], ou o posicionamento de eletrodos na extremidade do capilar [50, 51]. Outra vantagem é que não há a necessidade de remover parte do recobrimento de

poliimida do capilar de sílica como nos métodos espectrofotométricos (janela de detecção).

Como pode ser observada na Figura 5, a detecção C^4D baseia-se no acoplamento de dois eletrodos tubulares metálicos externos ao capilar de sílica fundida [48].

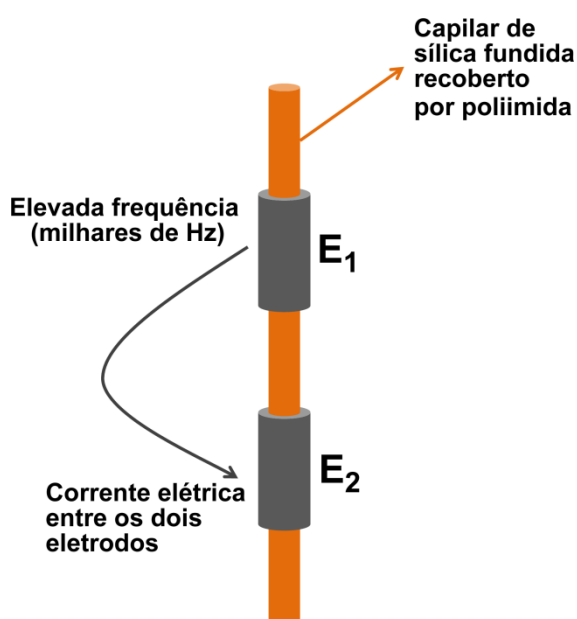


Figura 5 – Esquema do sistema de detecção C^4D . E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção. Adaptada de [24].

Neste detector, aplica-se um sinal senoidal de alta frequência, da ordem de centenas de kHz, em um dos eletrodos. As espécies iônicas do eletrólito e da amostra permitem a passagem de uma corrente elétrica proporcional à condutividade até o outro eletrodo e, posteriormente, esta corrente gerada é conduzida ao circuito eletrônico. Após o tratamento do sinal analítico, o mesmo é conduzido ao dispositivo de registro por meio de uma interface. Existe uma frequência ótima de trabalho, na qual a resistência da

solução é relevante e pode ser determinada através da corrente que flui entre os dois eletrodos, pois, dependendo do valor dessa frequência, a resistência da solução no interior do capilar pode ser irrelevante e o detector não registrar as variações na condutância [48, 52-54].

A resposta do detector é devida a substituição do co-íon presente no eletrólito pelo analito. Nos casos em que o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do eletrólito ocorre um aumento da condutividade nessa região, o qual é registrado como sinal positivo. Inversamente, se o co-íon apresenta maior mobilidade que o analito, o pico é registrado como sinal negativo. As vantagens deste tipo de detecção, além da facilidade de posicionar os eletrodos, é o desacoplamento entre o circuito de detecção e potencial de separação e, devido ao posicionamento externo dos eletrodos (sem possibilidade de contaminação) [48]. Com isso, a C^4D vem ganhando espaço rapidamente como forma de detecção em sistemas de CE.

1.5.2 – Detecção por espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas (MS) é um tipo de detecção acoplada a CE que surgiu em 1987, relatada primeiramente por Olivares *et al.* [55]. O sucesso desta combinação alia o alto poder de resolução e eficiência da CE com a universalidade e sensibilidade que a MS oferece quando comparada a outros métodos de detecção [56-60]. A MS é uma alternativa muito utilizada na quantificação de compostos conhecidos e identificação de compostos desconhecidos, e, basicamente, envolve a geração de íons que são posteriormente detectados.

Simplificadamente, um espectrômetro de massas é dividido em uma fonte de íons, que possa levar moléculas da fase líquida para a fase gasosa e ao mesmo tempo conferir carga a estas moléculas, um analisador da relação carga/massa destes íons e um

detector. Normalmente, a técnica de ionização por electrospray (ESI, do inglês "*electrospray ionization*") é a mais utilizada por produzir íons com número de cargas elevado e permitir que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa [61].

Como em CE uma alta tensão é aplicada entre as duas extremidades do capilar, nos equipamentos de CE-MS, o circuito elétrico precisa ser fechado para que a separação ocorra corretamente. Para isso, em uma das extremidades, coloca-se a combinação de um líquido auxiliar que mantém o contato fechado e um gás nebulizador responsável pela formação do spray durante o processo de dessolvatação e ionização da amostra. O analito ao sair do capilar sofre ionização à pressão atmosférica, passando por um capilar aquecido, sendo transferido para regiões de pressões reduzidas até uma zona de alto vácuo, passando pelos analisadores por onde ocorre a separação dos íons. Os íons são então concentrados para uma melhoria no sinal e, subsequentemente, detectados [56].

Em CE-MS, solutos que apresentam pequenas variações no tempo de migração, ou até mesmo que migrem com mesma velocidade, podem ser identificados e, com isso, a CE-MS vem ocupando um espaço crescente na química analítica [62-65]. Apesar da maioria dos trabalhos empregando CE-MS estarem relacionados com as ciências da vida [66], existem trabalhos disponíveis nas mais diferentes áreas, envolvendo outras modalidades de CE acopladas à MS [67-69].

1.6 – Determinação simultânea de cátions e ânions por CE-C⁴D

A CE-C⁴D é amplamente utilizada na separação e determinação simultânea de compostos iônicos. Na área farmacêutica, grande parte das moléculas usadas como

princípios ativos é produzida em forma de sais com o intuito de melhorar a sua estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade [70]. O controle de qualidade desses produtos é indispensável para garantir que os usuários não tenham efeitos indesejáveis [71, 72]. A determinação de princípios ativos e seus respectivos contra-íons trazem informações adicionais sobre a composição do medicamento, como a estequiometria do sal usado na formulação [73]. A estequiometria da maioria dos sais usados como princípios ativos na área farmacêutica é de 1:1. Quando este resultado não é obtido, podemos concluir que existem indícios da presença de impurezas na formulação ou até mesmo sobre a existência de processos de degradação ou hidrólise do princípio ativo. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de métodos que permitam a separação simultânea de espécies aniônicas e catiônicas em CE é de grande interesse.

Existem na literatura trabalhos que fazem a determinação simultânea de cátions e ânions por HPLC, nos quais são usadas como fase estacionária resinas de troca catiônica e aniônica paralelamente (simultaneamente) [74, 75] ou colunas poliméricas de caráter anfótero [76]. Porém, o uso destas técnicas para análises simultâneas de cátions e ânions requer instrumentação complexa, injetores duplos e, muitas das vezes, mais de um tipo de eluente e/ou coluna, aumentando o custo da análise [77].

A utilização de sistemas de CE- C^4D na determinação simultânea de cátions e ânions pode contornar os problemas citados acima e para isso algumas estratégias são usadas. Uma delas, e a mais relatada, foi introduzida por Kubán e Karlberg [78] e consiste na injeção da amostra em ambas as extremidades do capilar com o detector posicionado próximo ao centro do capilar. Assim, os cátions são injetados na extremidade anódica e os ânions na extremidade catódica. Com a aplicação da voltagem, cátions e ânions migram em direção opostas em direção ao detector [79-82].

Outra estratégia bastante explorada é a utilização do sistema de CE regular e um EOF com alta velocidade de migração, a fim de mover os analitos catiônicos e aniônicos na mesma direção. Esta estratégia pode ser utilizada com o EOF normal ou com EOF invertido [83], desde que o EOF tenha grande magnitude (pH acima de 7) [84-87]. Por último, uma estratégia não tão comum, é a complexação de espécies catiônicas com um composto quelante obtendo espécies carregadas negativamente, as quais podem ser separadas de modo convencional (EOF invertido) juntamente com os demais analitos aniônicos [88-90].

1.7- Análises rápidas por CE usando capilares de dimensão reduzida

A alta eficiência permitida nas análises por CE permite o desenvolvimento de métodos rápidos, com a obtenção de eletroferogramas na escala de tempo de segundos. Os métodos rápidos têm sido aplicados à análise de alimentos [91], matrizes biológicas [92, 93], biocombustíveis [94], fármacos [95-97], entre outros [98, 99]. Algumas estratégias para diminuir o tempo de análise incluem a utilização de instrumento com vários capilares, o qual permite realizar separações de várias amostras simultaneamente [100], ou, a utilização de capilares com comprimento reduzido [101].

A utilização de capilares curtos operando sob condições de campos elevados oferece a base para executar separações muito rápidas. O tempo de migração (t_m) das espécies 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 [102].

$$t_m = \frac{lL}{E (\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

Equação 8

Assim, ao aumentar o potencial aplicado ou reduzir o comprimento do capilar e seu diâmetro interno, obtêm-se reduções significativas nos tempos de migração das espécies. Nos casos em que se aumenta consideravelmente o potencial aplicado, a implementação de isolamento elétrico e de sistemas de blindagem é necessária para evitar descargas de faíscas, mas esses problemas podem ser evitados, se l e/ou L , forem reduzidos sob condições de tensões moderadas [102].

1.8 – Ácido acetilsalicílico e ácido salicílico

O ácido acetilsalicílico (AAS), conhecido popularmente como aspirina, foi primeiramente produzido há mais de 100 anos e, é ainda, uma das drogas mais utilizadas no mundo [103, 104]. Esta molécula tem propriedades analgésicas e antipiréticas e também pode ser utilizada como um agente anti-inflamatório. Geralmente é usada como analgésico em tipos de dores menos graves, tais como dor de cabeça, cólica menstrual, mialgia e dor de dente [105]. O AAS também pode prevenir a formação de coágulos no interior dos vasos sanguíneos inibindo a agregação plaquetária, evitando assim certas doenças ligadas ao aparelho cardiovascular [106]. No entanto, a ingestão intencional ou acidental de grandes quantidades de salicilatos (produto de hidrólise do AAS) representa um importante problema de envenenamento tornando-se necessário o controle de qualidade das formulações em que eles estão presentes [107].

O ácido salicílico (AS) é o principal metabólito do AAS [108, 109]. Em humanos, ao ingerir o AAS, ele é rapidamente hidrolisado a AS por esterases não-específicas presentes em muitos tecidos e depois é eliminado do corpo através da excreção renal e hepática [110].

Para perspectivas farmacológicas e toxicológicas, é desejável que um método analítico utilizado no controle de qualidade de ingredientes ativos em formulações farmacêuticas também permita a detecção de seus produtos de hidrólise ou degradação. A detecção simultânea de AAS e AS pode ser considerada como um exemplo, pois a ingestão em excesso de salicilato pode causar envenenamento [105]. Assim, alguns métodos utilizando colorimetria [111], fluorimetria [110], GC [112], HPLC [113, 114] e até mesmo CE [115, 116], foram desenvolvidos com o intuito de determinar o AAS e seus metabólitos em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos.

O AAS possui um pK_a igual a 3,4, portanto, em solução com pH acima de 2, as moléculas de AAS começam a se desprotonar apresentando uma carga negativa. Com o aumento do pH da solução, a porcentagem de moléculas na forma aniônica (desprotonadas) vai aumentando chegando a 100 % em pH próximo de 6, conforme pode ser observado na Figura 6 [117].

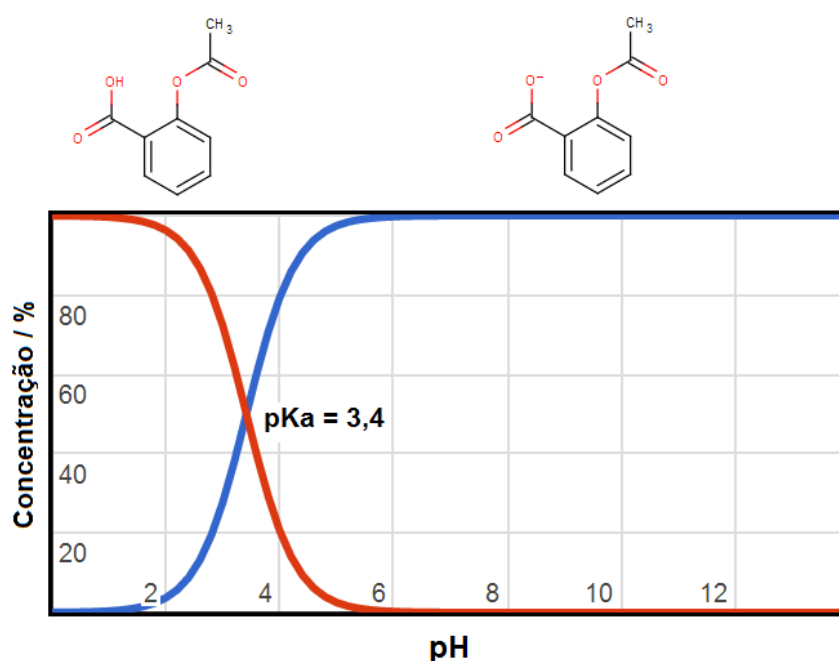


Figura 6 – Distribuição do AAS em solução aquosa em função do pH [117].

Similarmente, a molécula de AS possui um pKa igual a 2,8, e, em solução com pH acima de 1,5 as moléculas de AS começam a se desprotonar se tornando aniônicas. Se o valor do pH for aumentado, a porcentagem de moléculas desprotonadas aumenta chegando a 100 % em pH próximo de 5, conforme pode ser observado na Figura 7 [117].

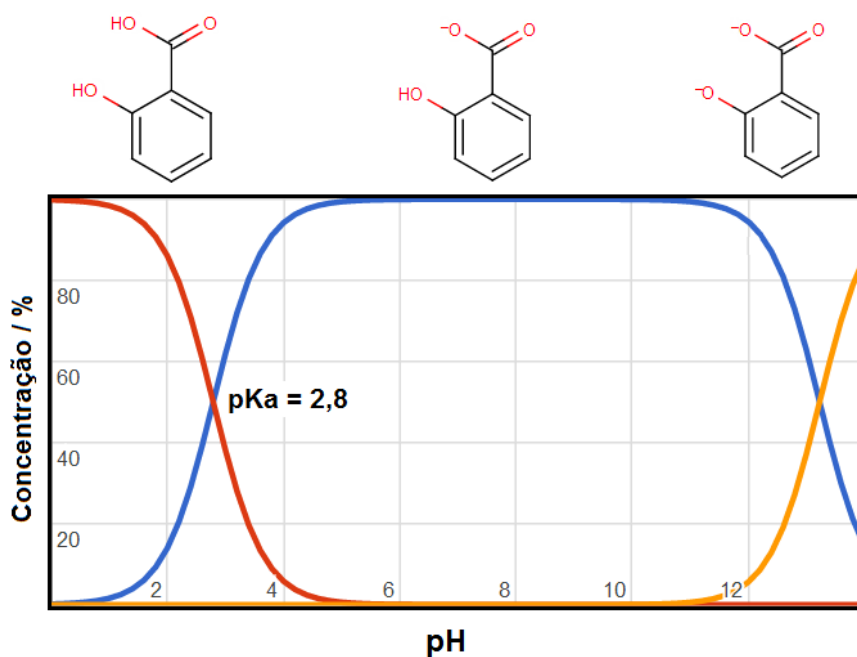


Figura 7 – Distribuição do AS em solução aquosa em função do pH [117].

Conforme pode ser observado, o AS tem um segundo pKa ($\sim 13,2$). No entanto, nesta região de pH, o AAS hidrolisa rapidamente a AS [118] e, portanto, um método de análise de AAS não pode ser usado nesta região de pH. Devido aos pKas apresentados, desde que eles tenham diferentes mobilidades eletroforéticas, é possível a determinação simultânea destes dois analitos (AAS e AS) por CZE, que é uma alternativa muito atrativa por ser mais rápida e simples, além de apresentar menor custo de análise do que as outras técnicas citadas anteriormente, como por exemplo a HPLC.

1.9 – Dipirona

Dipirona (DIP), também conhecida como metamizol ou novalgina, é comumente usada como analgésico e antipirético, e é considerada uma pró-droga devido ao seu mecanismo de ação. Após sua ingestão oral ou aplicação intravenosa, o ingrediente ativo conhecido como 4-metilaminoantipirina (4-MAA) é rapidamente gerado como produto de hidrólise e é então absorvido e bio-transformado por reações enzimáticas [119, 120]. Seu uso tem sido restrito ou proibido em alguns países por causa dos supostos riscos de reações adversas, em particular a agranulocitose [121, 122]. Mas, apesar de seus efeitos colaterais, ela é amplamente utilizada tanto em pacientes adultos quanto pediátricos devido ao seu forte efeito analgésico, baixo custo e por não necessitar de prescrição [119].

Devido ao seu valor de pK_a (- 1,2), 100% das moléculas de DIP estarão na sua forma aniônica ou desprotonadas, independente do pH da solução, conforme mostrado na Figura 8. Assim, a análise de DIP por CZE é facilitada.

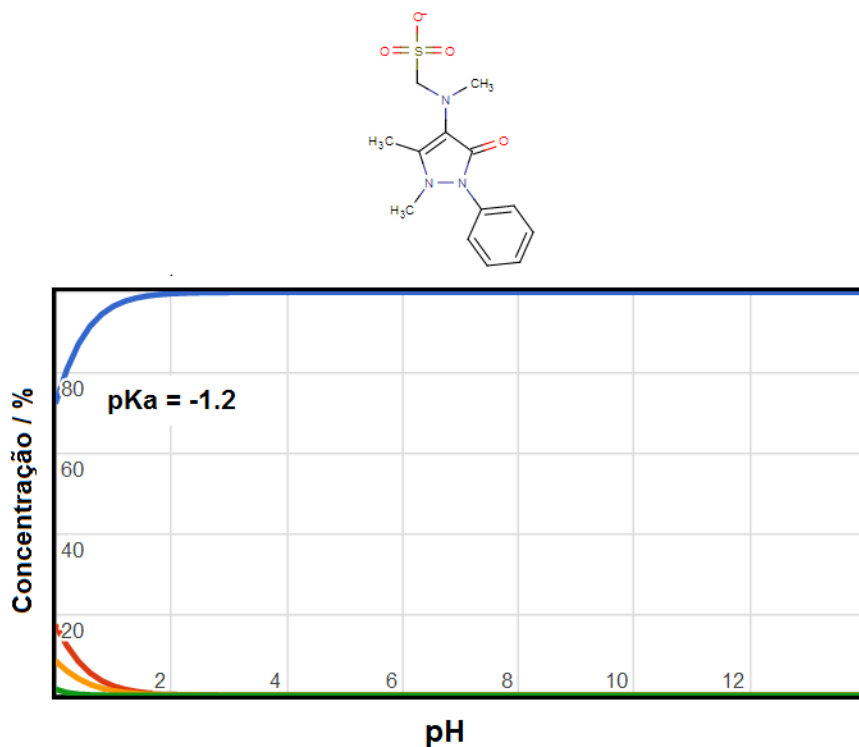


Figura 8 – Distribuição da DIP em solução aquosa em função do pH [117].

No entanto, a determinação do principal metabólito da DIP, o 4-MAA, não é possível por CZE por ser uma base fraca com $pK_a = 1,3$. Assim, 100% das suas moléculas estarão na forma neutra em uma ampla faixa de pH ($pH > 2$) [117]. Simultaneamente à formação do 4-MAA, tem-se a geração de outro metabólito, o hidroximetanosulfonato (HMS) [123, 124]. Esse poderá ser determinado nas análises por CZE, dependendo da condutividade do BGE utilizado, pois será um ânion em toda a faixa de pH ($pK_a = -1,8$) [117].

1.10 – Dipirone e ácido acetilsalicílico na presença de outros princípios ativos

Algumas drogas são adicionadas simultaneamente em uma formulação farmacêutica. Isso acontece porque o efeito farmacológico de uma droga pode ser

potencializado (sinergismo) na presença de outra, ou ainda, o efeito obtido pela ingestão combinada dos fármacos é maior do que o obtido por cada uma delas separadamente, trazendo uma maior eficácia no tratamento. Devido a esse efeito sinérgico, várias formulações farmacêuticas contendo cafeína (CAF) e DIP ou CAF e AAS são comercializadas.

A cafeína (CAF) é um alcalóide largamente utilizado nos produtos naturais e comumente utilizada em bebidas e formulações farmacêuticas. Esta molécula tem muitos efeitos fisiológicos, tais como a estimulação do sistema nervoso central, a secreção de ácido gástrico e diurese [125]. Embora não tenha atividade analgésica, a CAF é usada em formulações com analgésicos devido às suas propriedades adjuvantes, aumentando em 40% o efeito do analgésico usado concomitantemente [126]. Provavelmente, isto acontece devido à sua capacidade em causar a dilatação dos vasos sanguíneos cerebrais, facilitando, assim, a absorção de outras drogas [127].

Em toda faixa de pH normalmente usada em análises por CE, a CAF é uma espécie neutra, conforme pode ser verificado na Figura 9.

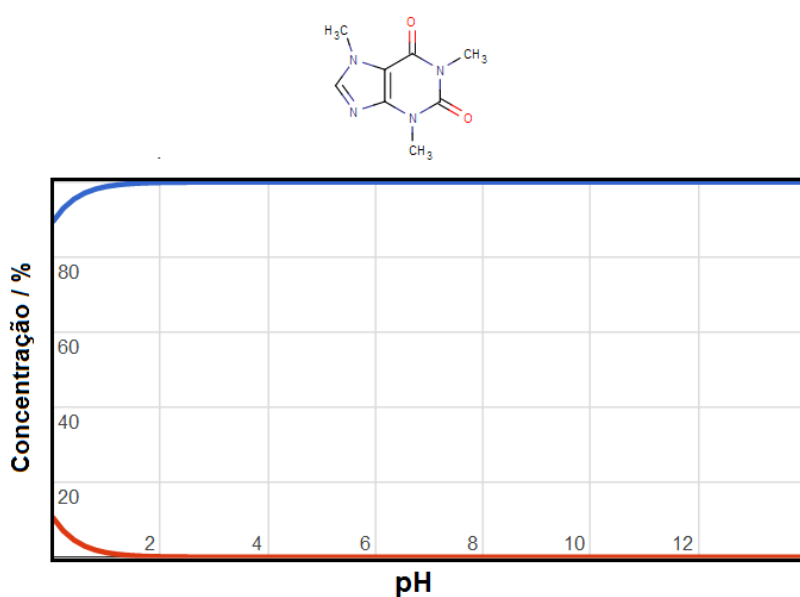


Figura 9 – Distribuição da CAF em solução aquosa em função do pH [117].

Logo, em CZE, sua migração no interior do tubo capilar é conduzida exclusivamente pela mobilidade do EOF, ou seja, a CAF não é separada das demais espécies neutras presentes na amostra. Com isso, o desenvolvimento de metodologias usando MEKC tem sido relatadas [128-134]. Outra possibilidade de proporcionar migração diferenciada para a cafeína em CE é sua complexação com o ânion 3,4-dimetoxicinamato, conferindo a molécula um caráter aniônico [135].

Um problema comum em todo o mundo é a falsificação ou adulteração de medicamentos usados por seres humanos e animais. A utilização destas drogas sem controle de qualidade adequado representa um risco para a saúde das pessoas. Consequentemente, a análise de formulações farmacêuticas visa não só o controle de qualidade industrial, mas também a verificação da idoneidade dos produtos [136]. Dentro deste contexto, muitos métodos analíticos têm sido relatados para a determinação destes fármacos individualmente (DIP, CAF, e AAS). No entanto, somente alguns métodos foram disponibilizados na literatura para a determinação simultânea desses compostos. Entre estes, somente dois métodos permitem a determinação simultânea de DIP e CAF: HPLC e espectrofotometria UV/vis [137, 138]. Para a determinação simultânea de AAS e CAF, um número maior de métodos estão disponíveis na literatura, tais como eletrocromatografia capilar de fase reversa [139], eletroforese capilar de zona com detecção por UV [140], espectrofotometria UV-vis [141-143] e HPLC [144-146].

Em algumas formulações farmacêuticas, a DIP também se encontra associada a outros princípios ativos, como a escopolamina (ESC), ou orfenadrina (ORF), ou ainda, mepiramina (MEP). Diferentemente da CAF, que é adicionada para potencializar o efeito do analgésico, estes princípios ativos, que possuem mecanismos de ação similares, tem um efeito resultante maior do que a simples soma dos efeitos isolados de

cada um deles. Além disso, alguns medicamentos indicados para amenizar sintomas provenientes de gripes e resfriados são formulados em dois comprimidos diferentes, um contendo os principais ingredientes ativos (DIP, CAF e MEP) e outro contendo somente ácido ascórbico (AA) ou vitamina C [147]. Neste caso, é recomendado ao paciente que ambos os comprimidos sejam ingeridos simultaneamente para um tratamento mais efetivo.

A ESC é um agente antimuscarínico comumente utilizado como analgésico e relaxante muscular suave. Adicionalmente, também pode ser usado como um agente anti-espasmódico, com efeitos antinauseantes, sendo recomendado para o uso no tratamento de enjôos e medicação pré-operatória [148]. Como pode ser visualizado na Figura 10, as moléculas de ESC apresentam um pKa igual a 7,0 [117].

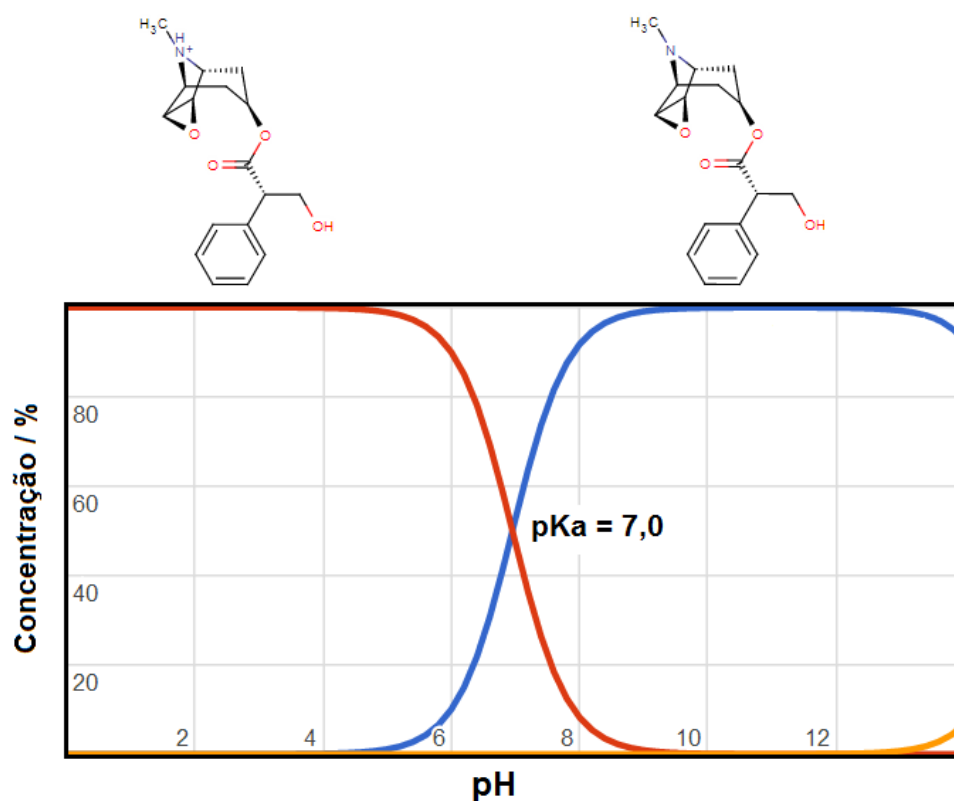


Figura 10 – Distribuição da ESC em solução aquosa em função do pH [117].

As moléculas de ESC, estarão 100% na forma neutra em soluções com pH acima de 9. Por outro lado, em soluções aquosas com pH inferior a 9 as moléculas adquirem uma carga positiva, possibilitando assim, a sua análise por CZE. No entanto, esse pKa não é o mesmo do encontrado na literatura (pKa 7,8) [149]. Segundo o valor de pKa localizado na literatura, as moléculas adquirem uma carga positiva em soluções aquosas com pH abaixo de 10.

ORF é um fármaco anticolinérgico com baixa atividade anti-histamínico. É utilizada no alívio da dor associada a contrações musculares traumáticas ou inflamatórias e geralmente, em medicamentos, está combinada com um anti-inflamatório não esteroide (AINE) [150]. A distribuição das moléculas de ORF em função do pH está representada na Figura 11 [117].

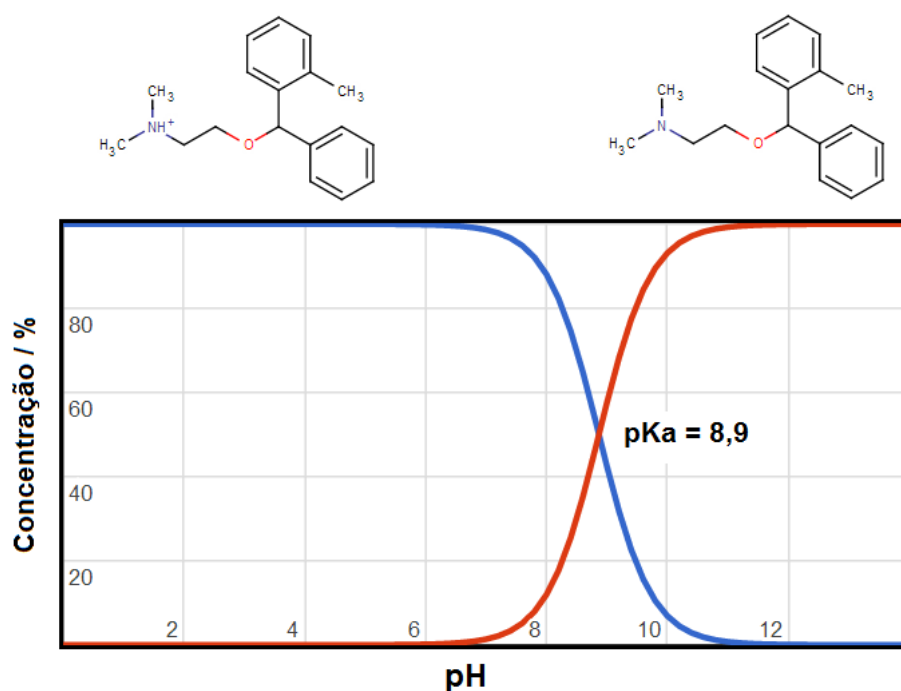


Figura 11 – Distribuição da ORF em solução aquosa em função do pH [117].

As moléculas de ORF se tornam neutras à medida que vai aumentando o pH da solução, assim, sua análise por CZE só será possível utilizando um BGE com pH menor que 11, no qual as moléculas adquirem uma carga positiva.

A MEP, também conhecida como pirilamina, é uma droga anti-histamínica, ou seja, neutraliza o excesso de histamina exercendo ação inibitória sobre espasmos. Ela tem também atividades anticolinérgicas e permeia o cérebro causando frequentemente sonolência [151]. A MEP apresenta dois valores de pKas ($pK_{a1} = 5,3$ e $pK_{a2} = 8,8$) como mostrado na Figura 12 [117].

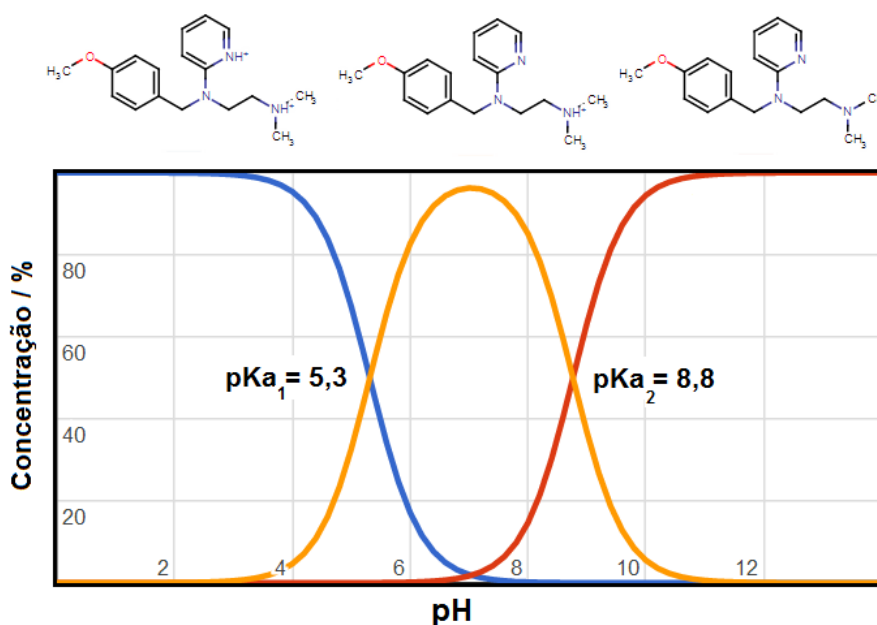


Figura 12 – Distribuição da MEP em solução aquosa em função do pH [117].

Em soluções com pH menor que 10, as moléculas de MEP começam a adquirir uma carga positiva (protonação) e, abaixo de pH 6, adquirem uma segunda carga positiva, e sua determinação também é possível por CZE.

O ácido ascórbico (AA), conhecido também como Vitamina C, é muito popular por causa da sua atividade antioxidante e por estar presente na dieta humana como uma

vitamina essencial. Também é utilizado na prevenção do escorbuto, tratamento de resfriado comum, doença mental, infertilidade, câncer e Aids [152]. Sua determinação por CZE é possível já que em soluções com pH acima de 2, o AA perde um próton e é convertido em um ânion, como pode ser verificado na Figura 13.

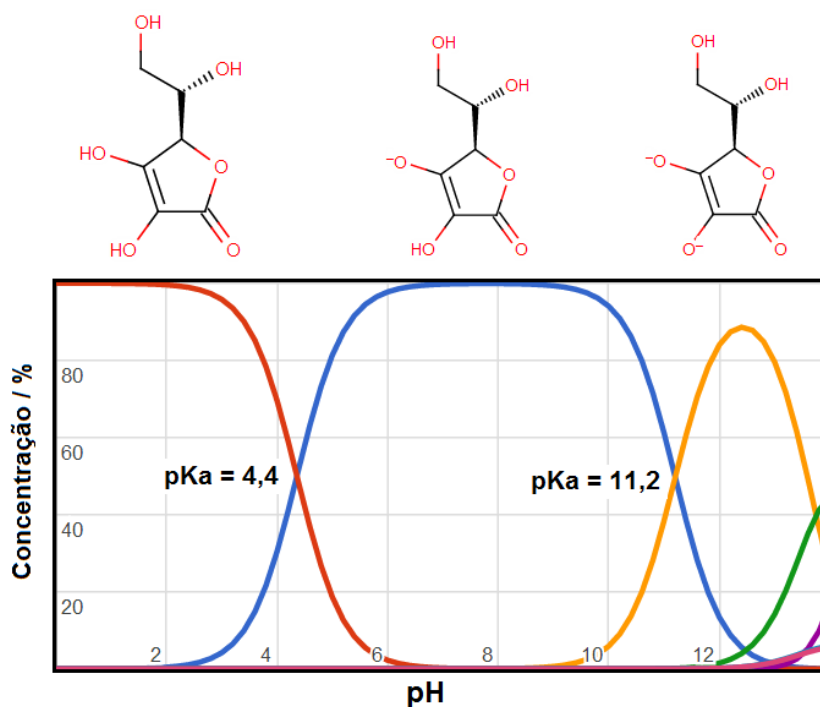


Figura 13 – Distribuição da AA em solução aquosa em função do pH [117].

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação simultânea de alguns dos compostos alvos do presente estudo, tais como DIP e AA [153, 154], CAF e DIP [138, 155, 156], CAF e AA [130, 157, 158], e CAF e MEP [159]. Em outro trabalho, comprimidos contendo simultaneamente DIP, CAF e ORF somente foram classificados (não quantificados) empregando espectroscopia no infravermelho próximo e ferramentas quimiométricas [150]. No entanto, segundo nosso conhecimento, não existem métodos analíticos descritos na literatura para o controle de qualidade de

formulações farmacêuticas contendo simultaneamente os seguintes princípios ativos: (1) ESC + DIP, (2) ORP + CAF + DIP, e (3) MEP + CAF + DIP + AA.

2 - Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas usando CE-C⁴D. Inicialmente foi proposto um método para determinar cafeína na presença de ácido acetilsalicílico (AAS) e dipirona (DIP). Posteriormente, o foco do trabalho foi estendido para a determinação de DIP na presença de outros princípios ativos (ESC, CAF, ORF, MEP e AA.). Adicionalmente também propomos o uso dos métodos propostos na determinação da pureza e grau de degradação do AAS e DIP. Neste trabalho são propostos métodos simples e rápidos de análise de formulações farmacêuticas contendo os seguintes princípios ativos:

- (i) Determinação de CAF na presença de AAS ou DIP;
- (ii) Determinação de DIP na presença de ESC ou de CAF + ORF ou de CAF + MEP + AA.

3 -Parte experimental

3.1- Reagentes e amostras

Todos os reagentes usados são de grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia. dipirona sódica (DIP), maletado de mepiramina (MEP), trietanolamina (TEA), ácido 3,4-dimetoxicinâmico (DMX), propano 2-Amino-2-hidroxi-1,3diol (TRIS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), hidróxido de lítio, histidina e carbonato de amônio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Ácido acetilsalicílico (AAS) e ácido ascórbico (AA) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Cafeína (CAF) e ácido salicílico (AS) foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brazil). Butilbrometo de escopolamina (ESC) e citrato de orfenadrina (ORF) foram adquiridos da empresa Henrifarma (São Paulo, SP, Brazil). Metilamina foi adquirida da Acros (Geel, Belgium) e fosfato de codeína foi adquirido da empresa Galena (Campinas, SP, Brazil).

Água deionizada ($18 \Omega \text{ cm}^{-1}$) foi obtida a partir de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). Metanol para uso como solvente (fase móvel) em HPLC foi adquirido da Vetec. Uma solução tampão (pH 8,4) contendo 20 mmol L^{-1} TRIS e de 10 mmol L^{-1} de DMX foi usada como eletrólito de corrida (BGE) na determinação simultânea de AAS, AS, CAF e DIP. Outro eletrólito de corrida que foi utilizado na determinação de DIP na presença de AA, CAF, ESC, ORF e MEP era composto por 12 mmol L^{-1} TEA e de 10 mmol L^{-1} de DMX (pH 8,5). Nos experimentos em CE-ESI-MS, uma solução contendo 10 mmol L^{-1} de carbonato de amônio (pH 9,2) foi usada como BGE.

Todas as soluções amostra e padrão foram preparadas diariamente em água deionizada e foram mantidos sob ultra-som durante 10 min para completa solubilização. Antes da injeção no sistema CE-C⁴D, todas as soluções resultantes foram filtradas com um filtro de membrana (tamanho de poro de 0,45 µm).

As amostras de formulações farmacêuticas contendo AAS + CAF ou DIP + CAF ou DIP + ESC ou DIP + CAF + ORF ou ainda DIP + CAF + MEP e AA foram adquiridas em farmácias locais em forma de comprimidos (drágeas). No procedimento de preparo das amostras, oito comprimidos de cada amostra foram pesados e em seguida macerados a um pó fino e homogêneo. Posteriormente, uma massa adequada do pó de cada amostra foi devidamente pesada e dissolvida em água até uma concentração situada na faixa linear do método proposto.

3.2 - Instrumentação

Os eletroferogramas foram obtidos com um equipamento CE-C⁴D construído no laboratório do Prof. Claudimir Lúcio do Lago do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP (São Paulo). O equipamento foi fornecido com dois detectores condutométricos sem contato compactos e de alta resolução acoplados capacitivamente [48, 160].

Uma imagem do equipamento de CE usado nos trabalhos realizados neste mestrado pode ser visualizada na Figura 14.



Figura 14 – Imagem do equipamento de CE-C⁴D usado na realização dos experimentos.

Esta versão utilizada de C⁴D não possui partes móveis, como potenciômetros e conectores, sendo assim considerado 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 [160]. Um programa de computador desenvolvido em ambiente LabView 8 (National Instruments, Austin, TX) é responsável pelo controle do equipamento e aquisição dos dados. O instrumento é equipado com uma fonte de alta tensão bipolar (Spellman Power Supply 30Kv).

Um esquema do sistema CE-C⁴D utilizada no trabalho pode ser visualizado na Figura 15.

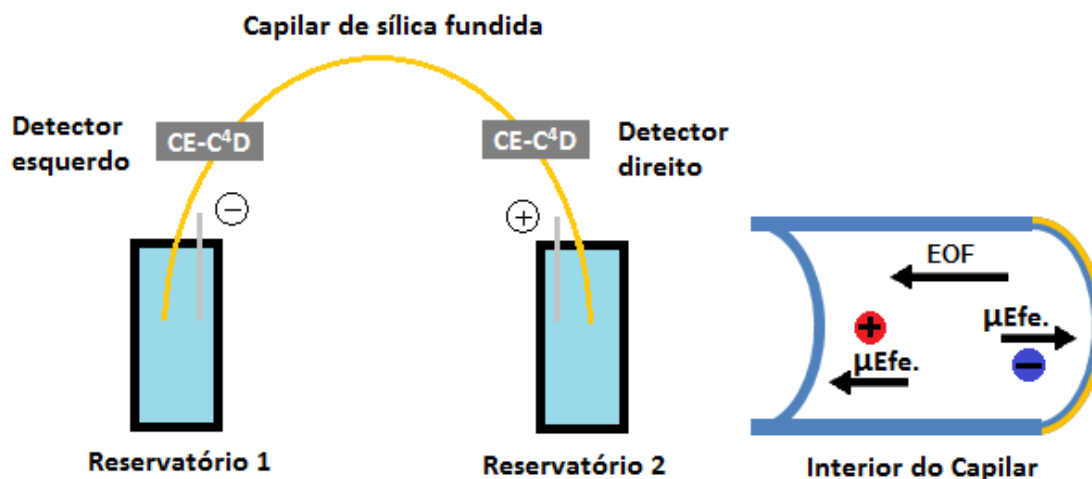


Figura 15 – Esquema do sistema CE-C⁴D usado nesse trabalho.

As injeções das soluções padrão ou amostra em todos os experimentos foram realizadas hidrodinamicamente (pressão positiva) no lado direito do equipamento (ânodo). Os detectores estavam posicionados ao longo do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida utilizado em todos os experimentos tinha 40 ± 3 cm de comprimento, 50 μm de diâmetro interno e de 375 μm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA, EUA). Todas os experimentos foram realizados utilizando o primeiro detector (comprimento efetivo de 10 cm).

Antes da utilização do sistema CE-C⁴D nas análises propostas, no início de cada dia, os capilares foram pré-condicionados por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos, em seguida com água deionizada durante 10 minutos e, finalmente, com BGE a ser utilizado nos experimentos durante 10 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 0,3 ou 0,5 s a uma pressão de 25 kPa. Todos os ensaios, exceto os de otimização, foram realizados com a aplicação de uma diferença de potencial de 25 kV.

Os experimentos por CE-ESI-MS foram realizadas utilizando um espectrômetro de massa triplo quadrupolo, modelo 6430 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Utilizou-se um capilar de sílica fundida de 70 centímetros de comprimento, com um diâmetro interno de 75 μm . O BGE utilizado nestes experimentos foi composto por 10 mmol L⁻¹ de carbonato de amônio (pH = 9,2). A diferença de potencial aplicada foi de 20 kV e as amostras foram injetadas a uma pressão de 10 kPa durante 5 s. O gás nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador a uma pressão de 25 psi e como gás carregador com vazão de 10 L min⁻¹ a 20 °C. Essa pressão e vazão foram inicialmente adotadas, mas elas foram otimizadas para alguns casos específicos. A menos que indicado de outra forma, o instrumento foi operado no modo positivo com voltagem capilar de 4000 V. A ionização por eletrospray (ESI, do inglês “electrospray ionization”) foi ajustada em 20 V, a tensão de aceleração de células para 3 V e o tempo de permanência para 200 ms. A temperatura era de 25 °C.

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 DIP, CAF, AAS e AS foi adaptada de [105] e era composta por metanol e água deionizada com pH corrigido para 2 com ácido fosfórico (40:60 v/v). Comprimento de onda de 250 nm e vazão de 1 mL min⁻¹.

4 - Resultados e discussões

4.1 - Metodologia para determinação rápida e simultânea de ácido acetilsalicílico, cafeína e dipirona em formulações farmacêuticas.

Em CE, a migração das espécies é dependente da somatória das suas mobilidades efetivas e da mobilidade do EOF. Com isso, a estratégia utilizada na maioria dos trabalhos de CE é ter as espécies de interesse (analitos) migrando no interior do capilar na mesma direção do EOF, tendo assim, uma maior velocidade de análise ($\mu_{ef} + \mu_{eo}$). Em um capilar de sílica fundida sem modificação, o EOF se movimenta na mesma direção dos cátions.

Em soluções aquosas, a CAF é uma espécie neutra em toda a faixa de pH normalmente empregada em CE (pH entre 2 e 12). Portanto, a análise de CAF por CE só é possível em meio micelar [128-134] ou se DMX é usado na composição do BGE, gerando assim, um complexo aniônico [135]. Resumidamente, CAF-DMX forma um complexo aniônico (constante de associação = $15,7 \text{ kg mol}^{-1}$) e pode ser descrito como um complexo molecular ligado hidrofobicamente, semelhante ao complexo CAF-clorogenato. Entre estas duas opções, optamos pelo uso do DMX na composição do BGE e, assim, a CAF poderá ser separada e detectada como ânion. Devido ao caráter aniônico das demais espécies que eram objeto de interesse no início do presente estudo, DIP ($\text{pK}_a = -1,2$), AAS ($\text{pK}_a = 3,4$) e AS ($\text{pK}_a = 2,8$), a estratégia a ser adotada para se ter um menor tempo de análise seria o uso do EOF invertido ($\mu_{ef} + \mu_{eo}$). Em CE, este objetivo é normalmente atingido através da adição de um agente tensoativo catiônico (por exemplo, CTAB) ao BGE e, por conseguinte, os ânions seriam analisados com maior velocidade e com maior resolução. No entanto, quando o surfactante catiônico

(CTAB) foi adicionado ao BGE, nenhum pico foi visualizado para a CAF, provavelmente devido à interferência das micelas de CTAB na complexação entre o DMX e a CAF [135]. Devido a esta interferência, o surfactante catiônico não foi utilizado e a separação de ânions no modo contra o EOF foi então adotada para a determinação simultânea de AAS, AS, CAF e DIP.

Antes de iniciar os estudos experimentais para identificar uma solução tampão que fosse adequada para separação e detecção de AAS, AS e DIP por CE-C⁴D, estudos preliminares foram realizados empregando um software de simulação de análises denominado PeakMaster[®] (versão 5.2) disponibilizado gratuitamente na internet por um grupo de pesquisa da República Tcheca [161]. Uma informação relevante para o uso do programa de simulação é o tempo do fluxo eletrosmótico. Quando esta informação é adicionada de forma correta ao simulador, os resultados obtidos podem ser muito similares aos obtidos experimentalmente. Como o DMX não está disponível na base de dados deste software, utilizamos outro ácido, 3-[[2-Hidroxi-1,1bis(hidroximetil)etil]amino]-1-propanossulfônico (TAPS), que proporciona um tampão na região de pH (~8,4) de interesse (EOF com elevada magnitude). Nas condições simuladas foi observada uma separação com boa resolução entre as espécies estudadas (AAS, AS e DIP). Além disto, foi possível verificar a ausência de picos na região do eletroferograma em que a CAF gera um pico quando complexada com DMX (imediatamente após o EOF) [135]. Posteriormente, estudos experimentais foram realizados. As simulações prévias foram importantes para definir as condições experimentais iniciais dos estudos.

O BGE contendo DMX ajustado com TRIS (pH 8,4), permite a determinação rápida e simultânea de AAS, AS, CAF e DIP utilizando o primeiro detector do equipamento CE-C⁴D (10 cm de comprimento efetivo). A Figura 16 apresenta os

eletroferogramas obtidos com o sistema CE- C^4D para diferentes concentrações do BGE, o qual era preparado fixando a concentração de DMX e adicionando TRIS até pH 8,4.

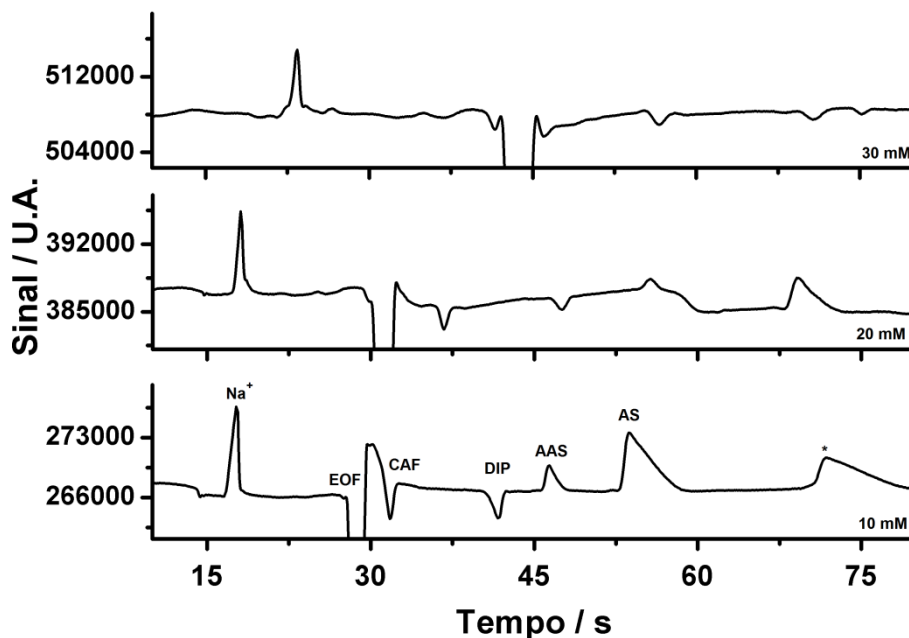


Figura 16 – Eletroferogramas obtidos em função da variação na composição do BGE (pH 8,4) contendo respectivamente DMX (30 ou 20 ou 10 mmol L⁻¹) ajustado com TRIS. Solução padrão injetada: CAF, DIP, AAS e AS (2 mmol L⁻¹ de cada). Demais condições: comprimento efetivo do capilar: 10 cm; diferença de potencial aplicada: 25 kV; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; diâmetro interno do capilar: 50 μ m.

Neste estudo, a solução padrão contendo os quatro analitos foi injetada no lado do ânodo. Os ânions, apesar de serem atraídos para o ânodo (potencial positivo), acabaram migrando em direção ao cátodo (potencial negativo), acompanhando a direção do EOF. Nesta condição (pH = 8,4), o EOF apresenta velocidade muito superior a dos ânions e na direção oposta. Neste estudo, os picos de CAF, DIP, AAS e AS foram detectados imediatamente após o EOF. Uma boa resolução foi obtida nos BGEs estudados, exceto para cafeína, mas essa resolução foi melhorada nos próximos estudos

de otimização. Os sinais obtidos demonstram que as soluções contendo DIP e CAF tem condutividade menor que a do BGE, e que, o AAS e o AS, tem condutividade maior que o BGE. Como pode ser observado na Figura 16, no BGE composto por 10 mmol L⁻¹ de DMX ajustado com TRIS, a velocidade da análise é ligeiramente maior do que nos tampões de maior concentração. A maior velocidade do EOF para o tampão de menor concentração é atribuída ao fato de o aumento da força iônica ocasionar uma compressão da dupla camada elétrica, diminuindo a magnitude do EOF. A concentração usada de TRIS para ajustar o pH do BGE foi calculada e fixada, assim, um BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TRIS + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 8,4) foi utilizado nos estudos seguintes.

Posteriormente, um estudo foi realizado com o intuito de verificar se a complexação da CAF teria que ocorrer antes da injeção (adição de DMX na solução padrão ou amostra) ou se esta complexação poderia ocorrer somente com o contato da CAF com o DMX após a injeção no sistema CE (DMX presente no BGE). Neste estudo, duas soluções padrão com composições diferentes foram injetadas. Na primeira, a solução contendo a cafeína foi diluída em água e a complexação aconteceria somente dentro do capilar (DMX no BGE). Na segunda, a solução de cafeína foi diluída diretamente no BGE e, o complexo entre a cafeína e DMX já foi formado antes da injeção no sistema. Na Figura 17 são apresentados os resultados obtidos neste estudo.

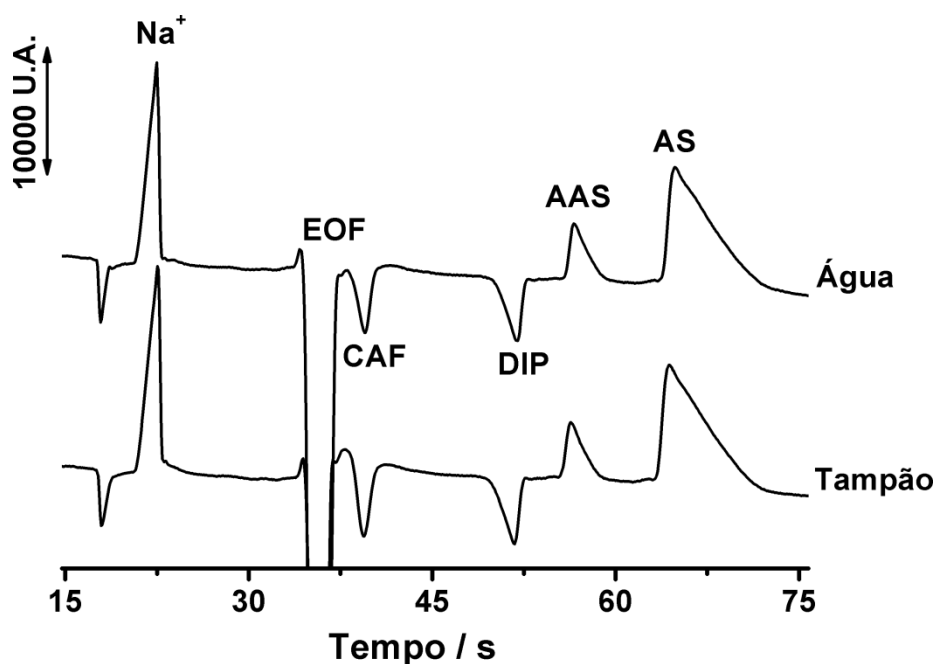


Figura 17 – Eletroferogramas obtidos pela injeção de solução padrão contendo CAF, DIP, AAS e AS (2 mmol L^{-1} de cada) preparada em água ou em solução tampão. BGE: 20 mmol L^{-1} TRIS/ 10 mmol L^{-1} DMX. Demais condições vide Fig. 16.

Como pode ser observado na Fig. 17, os eletroferogramas obtidos com a injeção das duas soluções padrões foram semelhantes, comprovando que não há necessidade de que as soluções padrões ou amostras sejam preparadas em meio de BGE, ou seja, a complexação que acontece somente dentro do capilar é rápida o suficiente para a separação e determinação de CAF por CE.

Nestas condições, além da possibilidade de determinação rápida e simultânea de CAF, DIP, AAS e AS em formulações farmacêuticas, uma caracterização estequiométrica da dipirona sódica (NaDIP) também é possível em cada análise [79]. A Figura 18 apresenta um eletroferograma típico de uma (A) solução padrão contendo CAF, NaDIP, AAS (2 mmol L^{-1} de cada) e AS (1 mmol L^{-1}), e dois eletroferogramas de soluções preparadas a partir de duas formulações farmacêuticas: (B) CAF e AAS, e (C)

CAF e DIP. Em todas as soluções, $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de lítio foi adicionado como IS (do inglês, “*internal standard*”).

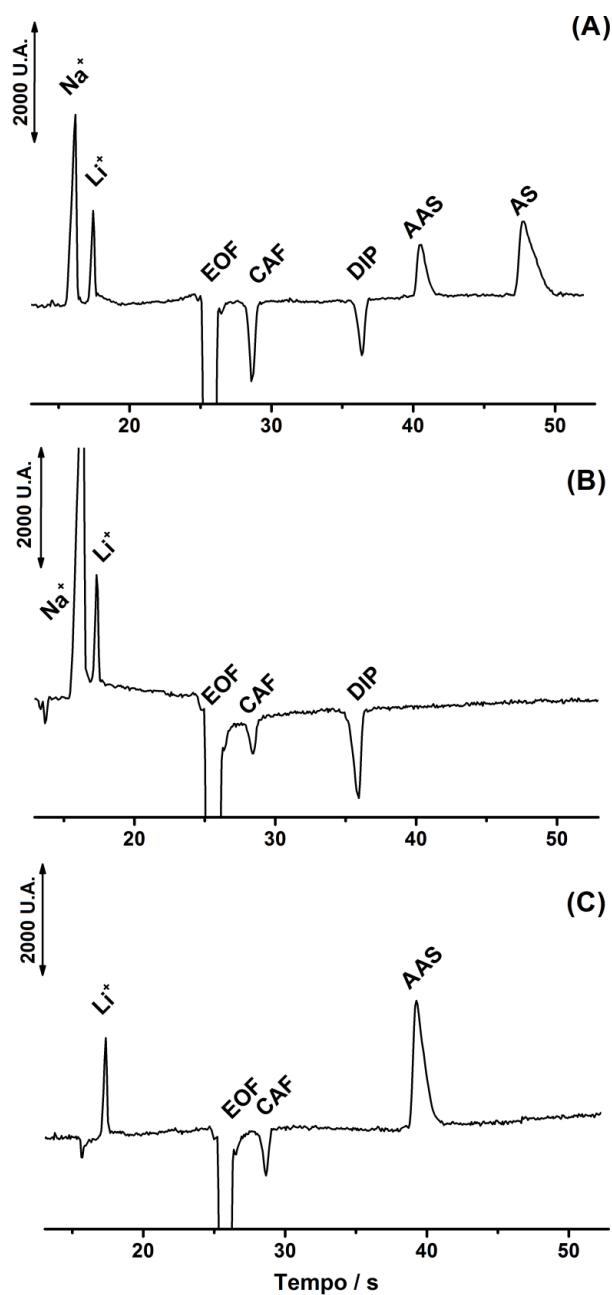


Figura 18 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de: (A) solução padrão contendo CAF, DIP, AAS (2 mmol L^{-1} de cada) e AS (1 mmol L^{-1}), e soluções preparadas a partir de amostras comerciais contendo (B) CAF e DIP, e (C) CAF e AAS. BGE: 20 mmol L^{-1} TRIS/ 10 mmol L^{-1} DMX; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $0,3 \text{ s}$. Demais condições vide figura 16.

A composição do BGE fornece ao sistema CE-C⁴D uma linha de base estável e estes resultados demonstram que o método proposto possibilita o controle de qualidade das duas formulações farmacêuticas, uma contendo CAF e AAS, e outra contendo CAF e DIP, pois sobreposições ou picos adicionais provenientes de interferentes (excipientes, por exemplo) não foram detectados.

A fim de se obter um melhor compromisso em termos de eficiência, resolução, razão sinal-ruído (SNR) e frequência analítica, estudos de otimização do método proposto como tempo de injeção (hidrodinâmica a pressão constante) foi estudado. Na Figura 19 são apresentados os resultados obtidos em função da variação no tempo de injeção.

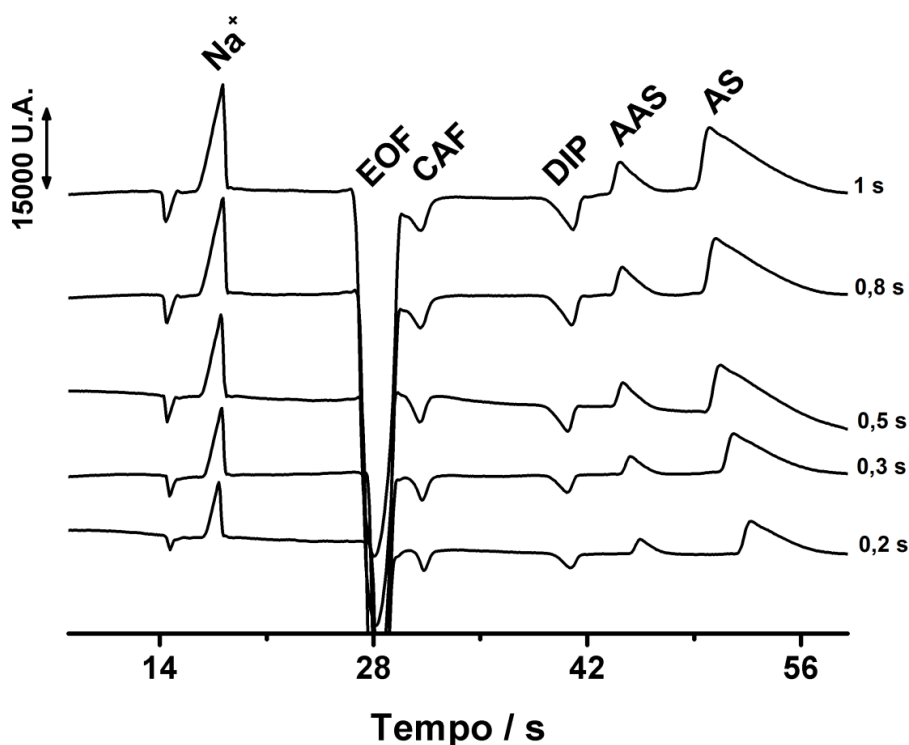


Figura 19 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo CAF, DIP e AAS (2 mmol L^{-1} cada) e AS (1 mmol L^{-1}). Pressão constante de injeção: 25 kPa; BGE: 20 mmol L^{-1} TRIS/ 10 mmol L^{-1} DMX. Demais condições experimentais vide figura 16.

Conforme apresentado na Fig. 19, é possível observar uma melhora na sensibilidade dos analitos com o aumento no tempo de injeção (aumento no volume injetado), no entanto, a resolução (especialmente para o pico da CAF) vai diminuindo. Assim, a opção foi por um tempo de injeção em que a resolução entre o EOF e o pico da CAF fosse adequada (0,3 s; 25 kPa). Conforme descrito na literatura [27], quanto maior o potencial aplicado, mais rápida é a análise e maior é a frequência analítica. Portanto, como um dos objetivos do trabalho é a determinação rápida, o potencial de 25 kV foi adotado nos estudos seguintes, pois este potencial além de permitir uma rapidez nas análises, apresenta uma boa resolução entre os picos. Um potencial de 30 kV não foi adotado por apresentar maior ruído de linha base, provavelmente, devido a fuga de alta tensão.

Após a otimização destes parâmetros foi realizado um estudo de repetibilidade para verificar a precisão do sistema. O desempenho do sistema com os parâmetros otimizados é mostrado na Figura 20 com a sobreposição de 10 eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo CAF, DIP e AAS (2 mmol L^{-1} de cada), AS (1 mmol L^{-1}) e lítio como IS ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Os resultados estatísticos calculados a partir dos dados desta figura são apresentados na Tabela 2.

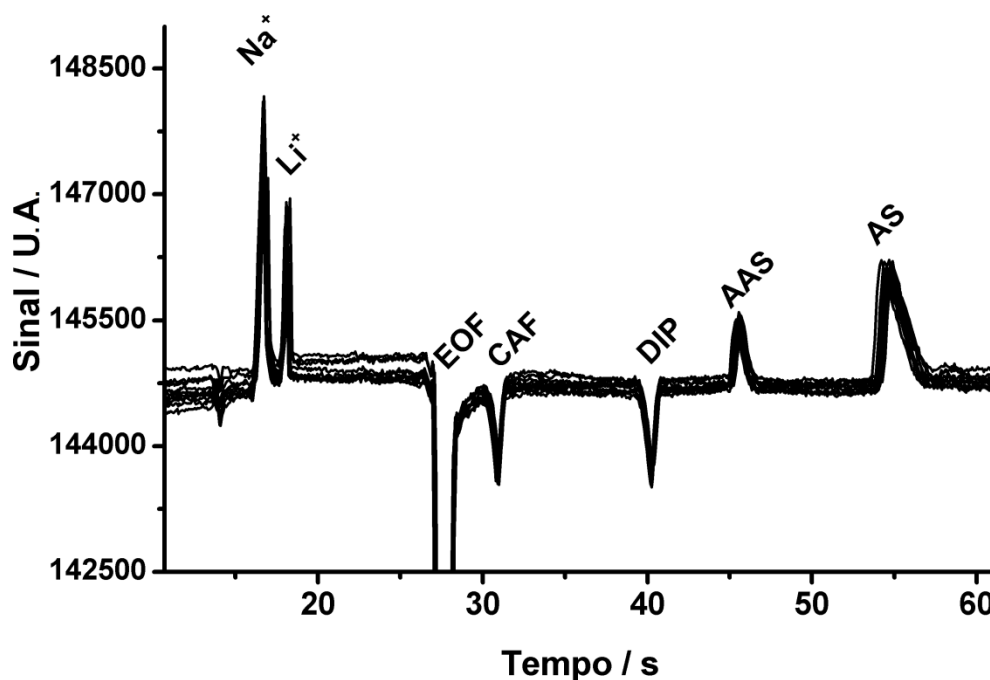


Figura 20 - Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo CAF, DIP e AAS (2 mmol L^{-1} de cada), AS (1 mmol L^{-1}) e lítio como IS ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Demais condições vide Figura 18.

Tabela 2 - Características analíticas do método proposto.

Analito	Faixa Linear (mmol L^{-1})	r	Tempo de migração ^a (s)	Área do pico ^a	LOD ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Resolução ^c
CAF	0,50 – 4,00	0,999	$27,9 \pm 0,1$	$8,4 \pm 0,5$	5	$1,8 \pm 0,1$
DIP	0,50 – 4,00	0,997	$37,3 \pm 0,1$	$10,1 \pm 0,6$	5	$6,3 \pm 0,4$
ASA	0,50 – 4,00	0,997	$42,6 \pm 0,2$	$9,24 \pm 0,4$	6	$3,2 \pm 0,2$
SA	0,25 – 2,00	0,994	$50,7 \pm 0,3$	$34,67 \pm 1,2$	2	$3,5 \pm 0,2$

a: $n = 10$; **b:** limite de detecção ($3S_b/S$ em que, S_b é o desvio padrão do ruído da linha base e S é a inclinação da curva analítica); **c:** calculado entre o pico do analito e o pico anterior; intervalo de confiança de 95%.

Os resultados obtidos no estudo de repetibilidade demonstram que o método proposto apresenta boa estabilidade com desvios padrões relativos inferiores a 6 e 0,6 % em relação à área e tempo de migração, respectivamente. Os LODs obtidos pela técnica, apesar de serem maiores que os obtidos por HPLC, são suficientes baixos para a quantificação destes princípios ativos em formulações farmacêuticos. Os eletroferogramas apresentaram uma resolução adequada entre os picos.

Após a otimização e a determinação da precisão do método, um estudo para definir a faixa linear de resposta para cada espécie foi realizado. O resultado obtido neste estudo é apresentado na Figura 21.

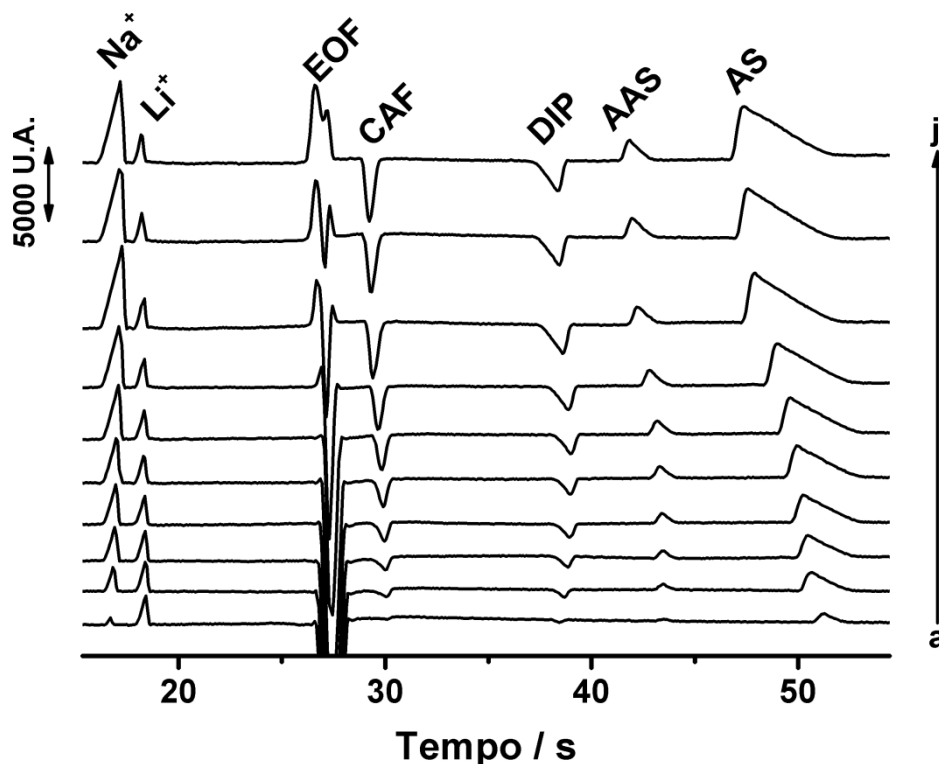


Figura 21 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF, DIP e AAS ($0,2 - 6 \text{ mmol L}^{-1}$) e AS ($0,1 - 3 \text{ mmol L}^{-1}$) com coeficientes de correlação de 0,995; 0,994; 0,992 e 0,991 para CAF, DIP, AAS e AS, respectivamente. Lítio foi usado como IS ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Demais condições vide Figura 18.

Como pode ser visualizado na Fig. 21, até mesmo em elevadas concentrações ainda obtém-se resolução satisfatória e uma proporcionalidade entre concentração e a condutividade detectada para todos os analitos ($r = 0,995$; $0,994$; $0,992$ e $0,991$ para CAF, DIP, AAS e AS, respectivamente). Posteriormente, uma menor faixa de concentração, com melhor linearidade, foi adotada para construção de uma curva analítica (pág. 52). A Figura 22 apresenta os eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF, DIP, AAS e AS e as suas respectivas curvas de calibração.

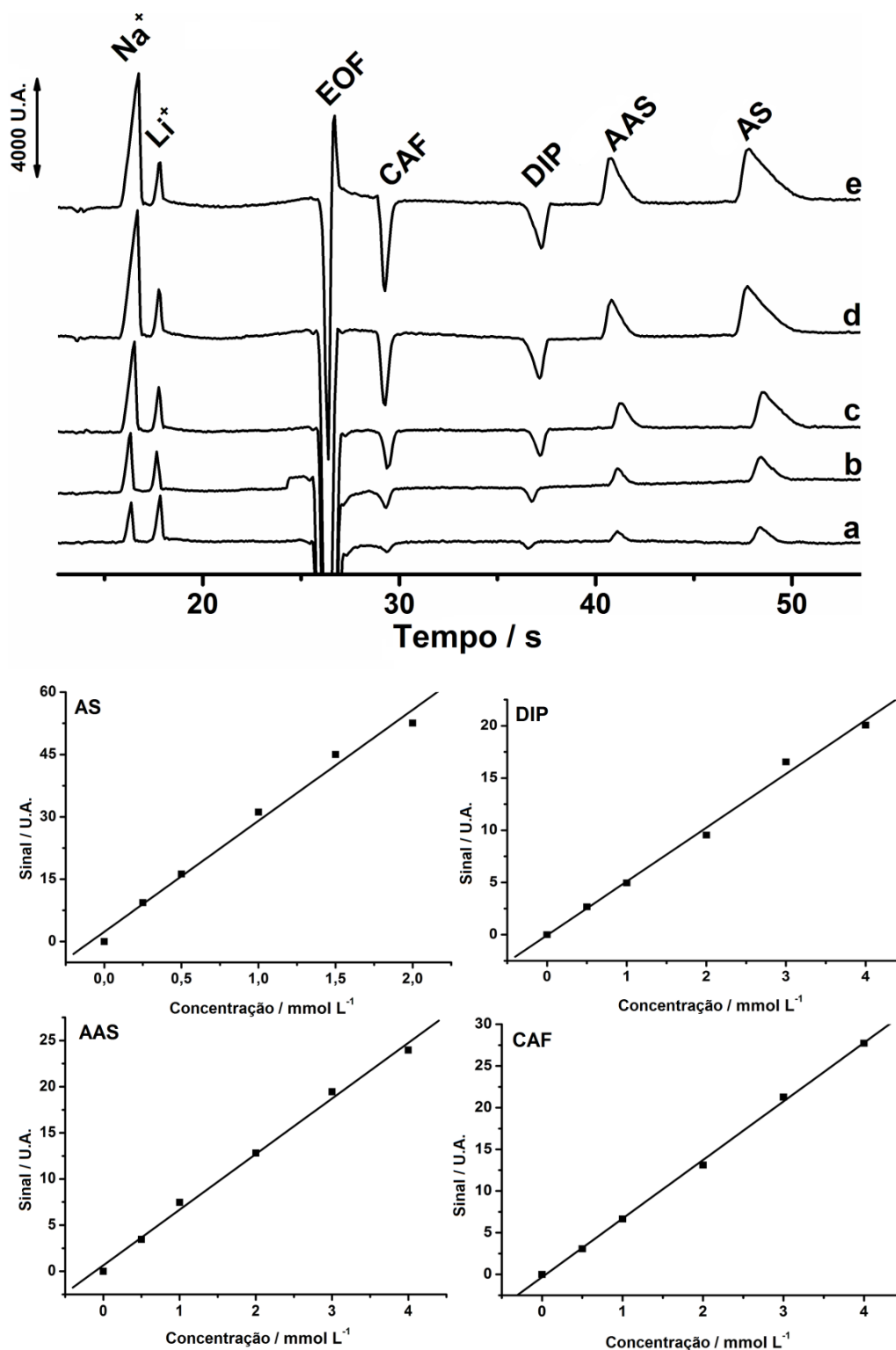


Figura 22 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF, DIP e AAS ($0,5 - 4 \text{ mmol L}^{-1}$) e AS ($0,25 - 2 \text{ mmol L}^{-1}$) e as suas respectivas curvas de calibração. Lítio foi usado como IS ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Demais condições vide Figura 18.

As curvas de calibração apresentaram boa linearidade para todos os analitos no intervalo de concentração estudado com a obtenção de coeficientes de correlação maiores que 0,994 em todos os casos. Os limites de detecção do método foram calculados a partir deste gráfico e são apresentados na Tabela 2 (pág. 49).

A exatidão do método EC-C⁴D proposto foi avaliada através da análise de quatro amostras de formulações farmacêuticas comerciais. A Tabela 3 apresenta uma comparação dos resultados obtidos com o método proposto aos obtidos por HPLC na análise destas amostras.

Tabela 3 - Comparação entre os resultados obtidos pela determinação simultânea de DIP, CAF e AAS usando CE-C⁴D e HPLC (n = 3).

Amostras	Bula			CE-C ⁴ D			HPLC		
	(mg / comprimido)			(mg / comprimido)			(mg/ comprimido)		
	DIP	CAF	AAS	DIP	CAF	AAS	DIP	CAF	AAS
1	500	65	-	503 ± 7	68 ± 3	-	498 ± 7	66 ± 2	-
2	500	65	-	499 ± 8	63 ± 2	-	496 ± 5	65 ± 2	-
3	-	30	500	-	29 ± 2	512 ± 8	-	32 ± 1	503 ± 8
4	-	30	500	-	28 ± 1	505 ± 8	-	30 ± 2	501 ± 6

Todos os resultados obtidos pelo método proposto (CE-C⁴D) são similares aos obtidos por HPLC. 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.

Além disso, o sinal detectado para sódio (Figura 22) também apresentou uma resposta linear em relação à concentração na mesma faixa de concentração da DIP ($0,5 - 4 \text{ mmol L}^{-1}$, $r = 0,998$), e, assim, a determinação estequiométrica do sal de NaDIP também é possível. A relação estequiométrica teórica para sal de NaDIP é de 1:1 (concentração molar). No entanto, este resultado somente é obtido para a forma correta de sal, na ausência de impurezas, ou ainda, da degradação / hidrólise de DIP. Portanto, o método proposto proporciona resultados rápidos e confiáveis para a caracterização estequiométrica da matéria-prima. Após a adição de NaDIP a uma formulação farmacêutica, a caracterização estequiométrica só é possível se outros sais de sódio não são usados como excipientes nesta formulação.

O método proposto também pode ser utilizado para a determinação rápida (em menos de 1 min), do grau de degradação / hidrólise do AAS e da DIP em matérias primas ou em formulações farmacêuticas. A Figura 23 mostra dois eletroferogramas de soluções padrão contendo 3 mmol L^{-1} AAS (A) ou DIP (B). Ambas as soluções foram analisadas antes (a) e após a exposição à radiação solar (degradação acelerada pela luz e calor) durante 30 (b), 60 (c) e 180 minutos (d).

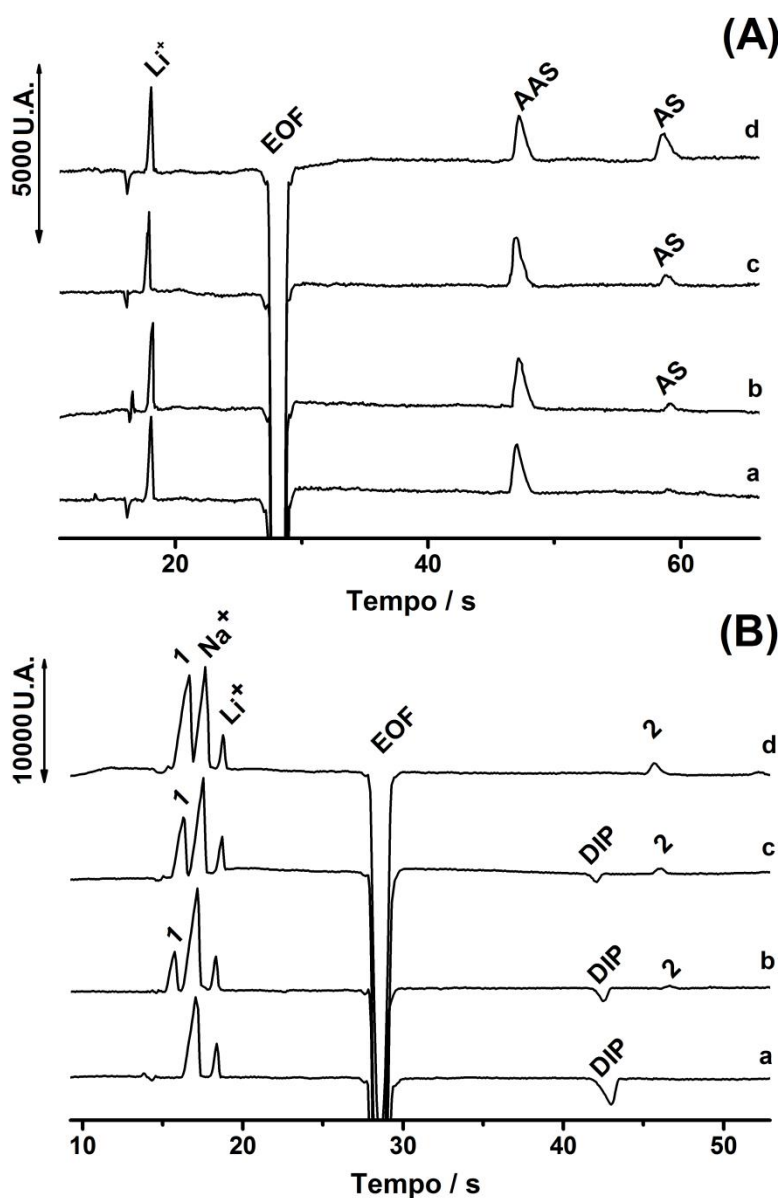


Figura 23 – Eletroferogramas obtidos na injeção de soluções padrão contendo 3 mmol L^{-1} de AAS (A) ou NaDIP (B) antes (a) e depois da exposição à luz solar por 30 min (b), 60 min (c), e 180 min (d). Lítio foi usado como IS ($700 \mu\text{mol L}^{-1}$). AS: ácido salicílico; Picos 1 e 2: produtos de hidrólise da DIP. Demais condições, vide figura 18.

Como pode ser observado na Figura 23A, o método proposto permite a detecção de um dos produtos de degradação do ácido acetilsalicílico na mesma corrida em cerca de 1 min. Os produtos da reação de hidrólise do AAS são bem conhecidos na literatura

como sendo AS e ácido acético [108]. Com o aumento do tempo de exposição à luz solar, o pico para o AS foi detectado.

Em um experimento semelhante realizado com uma solução contendo 3 mmol L^{-1} de NaDIP, dois picos adicionais correspondentes aos produtos de degradação foram detectados (os picos 1 e 2 ; Fig. 23B), além de uma diminuição considerável do pico da DIP. De acordo com a literatura, um dos produtos de hidrólise de DIP é 4-metilaminoantipirina (4-MAA) [120]. No entanto, devido ao seu valor de $\text{pK}_a = 1,3$, o 4-MAA é uma base fraca, sendo uma espécie neutra no BGE usado nas análises por CE (pH 8,4), e, portanto, não é detectável no sistema CE- C^4D . Outros produtos de hidrólise formados simultaneamente com 4-MAA é o hidroximetanosulfonato [162], que apresenta uma carga negativa no pH da solução tampão utilizada nestes experimentos (8,4), e, provavelmente pode ser a espécie detectada imediatamente após o pico de DIP (Fig. 23B, pico 2). Além disso, outro produto de hidrólise foi detectado com boa sensibilidade próximo ao pico do sódio (Fig. 23B; pico 1). Embora haja vários estudos disponíveis na literatura sobre a hidrólise ou a degradação de DIP [119, 120, 124, 162], nenhum desses trabalhos relata a formação de um cátion com baixo peso molecular proveniente da hidrólise ou degradação da DIP.

Simulações realizadas com o programa Peakmaster [161] indicaram que o cátion suspeito poderia ser a metilamina. Por isso, estudos utilizando CE- C^4D e uma solução padrão de metilamina foram realizados. O produto de hidrólise e a metilamina apresentaram o mesmo tempo de migração. Portanto, trata-se de uma forte evidência de que o produto de degradação da DIP é a metilamina.

Buscando investigar melhor o cátion suspeito, vários testes foram realizados utilizando um equipamento de eletroforese capilar acoplado a um detector de massas

(CE-ESI-MS) disponibilizado pelo Prof. Dr. Claudimir Lúcio do Lago em seu laboratório no IQUSP (São – SP). Primeiramente, foi realizado uma varredura de massa em modo positivo e em modo negativo, com finalidade de detectar o pico de massa da dipirona ainda não hidrolisada (m/z 312). Este mesmo procedimento foi repetido com um padrão exposto à luz solar para detectar os produtos da hidrólise da DIP. No modo positivo, um pico adicional com valor m/z 32 foi detectado, similar aos resultados obtidos por CE- C^4D , pois o pico em CE-MS também tinha tempo de migração próximo ao pico referente ao sódio.

Como não havia nenhum trabalho na literatura que corroborava com este resultado, estudos adicionais foram realizados para confirmar esta suspeita. Como o sódio é um cátion proveniente de uma base forte e a metilamina de uma base fraca ($pK_a = 10$), um estudo com BGEs (NH_4OH/NH_4CO_3) de três pHs distintos foram realizados usando CE-MS (7,3; 9,2 e 10,9). Em pH 7,3, a razão m/z 32 foi localizada antes do pico do sódio e em pH 10,9, a razão m/z 32 foi localizada depois do pico do sódio. Além disto, na amostra exposta ao sol, uma alíquota de solução padrão de metilamina foi adicionada e um aumento na intensidade do pico da metilamina foi detectado por CE-MS. Ainda na varredura de massa no modo positivo, na solução de DIP exposta ao sol foi confirmada a presença do 4-MAA (m/z 218), assim como a do hidroximetanosulfonato (m/z 111).

Em seguida, estudos foram realizados por CE-MS no modo de monitoramento de íons selecionados. A Figura 24 mostra os eletroferogramas obtidos por CE-MS de uma solução contendo 1 mmol L^{-1} DIP antes (A e B) e depois (C e D) de sua exposição à radiação solar durante 45 minutos.

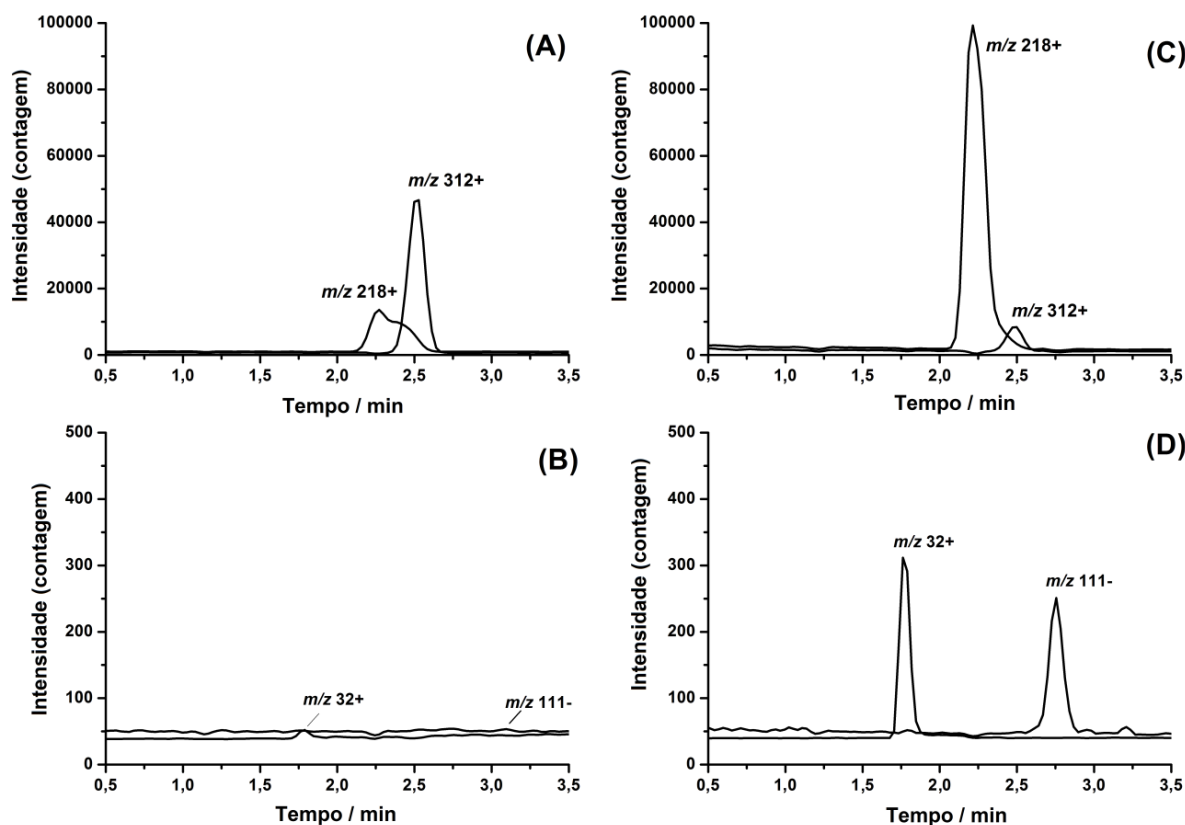


Figura 24 – Eletroferogramas obtidos por CE-MS no modo de monitoramento de íons selecionados antes (A e B) e depois (C and D) da exposição à luz solar. m/z 312 (DIP); m/z 218 (4-MAA); m/z 32 (metilamina); m/z 111 (hidroximetanosulfonato).

No BGE 10 mmol L⁻¹ (NH₄)₂CO₃ pH 9,2, a DIP migra em sua forma aniônica, no entanto, a sensibilidade é maior para a sua forma protonada (m/z 312). O produto de hidrólise neutro (4-MAA) é transportado pelo EOF e detectado como sua forma protonada (m/z 218). Metilamina e hidroximetanosulfonato, outros produtos de degradação de DIP, migram como um cátion e um ânion, respectivamente, e foram melhores detectados como tal m/z 32 e 111. Embora o BGE aqui utilizado seja diferente do que foi utilizado para CE-C⁴D, o pH é semelhante (pH 9,2) e a DIP também migra como uma espécie aniônica. No entanto, a sensibilidade da espectrometria de massa para esta espécie não é tão elevada como para a de DIP protonada. Portanto, a detecção de DIP foi feita a m/z 312 no modo positivo. O produto de hidrólise 4-MAA é neutro e,

portanto, ele é transportado pelo EOF, enquanto que a detecção foi feita em m/z 218 no modo positivo.

A degradação de DIP é claramente mostrada na Figura 24. No entanto, existem outras características que devem ser consideradas. Há a presença de 4-MAA antes da amostra ser exposta à luz do sol. Além disso, a forma do pico de m/z 218 sugere que o 4-MAA está sendo formado enquanto DIP migra no BGE a pH 9,2. A eficiência do método CE-ESI-MS é claramente menor do que a obtida pela CE-C⁴D, o que pode ser parcialmente atribuído à sucção do electrospray, o que induz um fluxo laminar no interior do capilar. No entanto, tem que se levar em conta que este método foi introduzido apenas para auxiliar na identificação das espécies formadas a partir da hidrólise de DIP, sem a realização de otimizações.

Foram efetuados estudos adicionais, a fim de verificar se o sistema CE-C⁴D proposto também é útil para a detecção dos produtos de degradação da DIP em amostras farmacêuticas. Estes estudos foram realizados com duas amostras farmacêuticas contendo DIP. Soluções das amostras foram analisadas antes e após a exposição à radiação solar durante 3 horas (Figura 25).

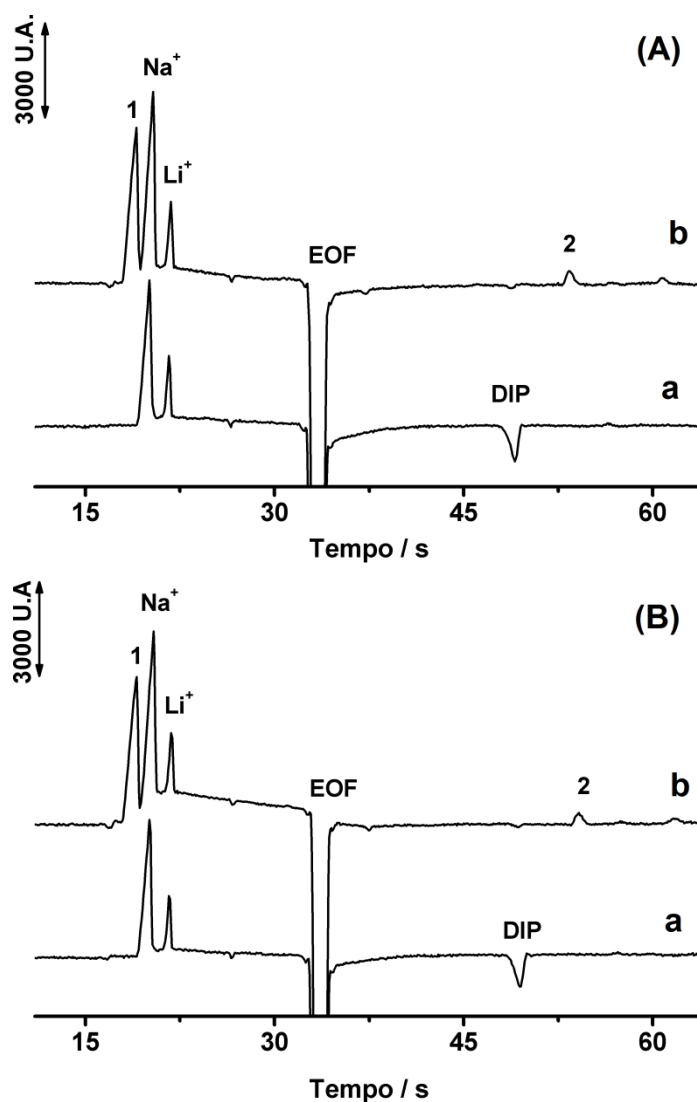


Figura 25 – Eletroferogramas obtidos na injeção de soluções amostras contendo NaDIP antes (a) e depois (b) da exposição à luz solar por 180 min. Lítio foi usado como IS ($700 \mu\text{mol L}^{-1}$). Pico 1: metilamina; pico 2: hidroximetanosulfonato. Demais condições, vide Figura 18.

Os resultados apresentados na Fig. 25 (obtidas com soluções amostras) são semelhantes aos apresentados na Fig. 23B (obtidas com soluções padrões). Os produtos de degradação da DIP (1: metilamina e 2: hidroximetanosulfonato) somente foram detectados em soluções de amostras depois da exposição à radiação solar. Estes resultados demonstram que essas drogas foram devidamente armazenadas, pois os

produtos de degradação não foram detectados nas amostras recém-preparadas. Além disso, é possível concluir que o método proposto também pode ser usado para a detecção dos produtos de hidrólise ou degradação em amostras farmacêuticas. A presença de ingredientes inativos não afetam os resultados obtidos na análise.

4.1.1 - Conclusões parciais

Os resultados aqui apresentados mostram que o sistema CE-C⁴D pode ser utilizado para a determinação rápida (em menos de 1 minuto) e simultânea de CAF, DIP e AAS. Os produtos de hidrólise ou degradação gerados a partir de AAS (ácido salicílico) e DIP (hidroximetanosulfonato e metilamina) também pode ser detectados em menos de 1 minuto. Além disso, é a primeira vez que metilamina foi identificada como um produto de hidrólise da DIP.

4.2 - Metodologia para determinação rápida de dipirona em combinação com outros princípios ativos.

Com o objetivo de continuar os estudos de controle de qualidade de formulações farmacêuticas, optamos por propor a análise de fármacos que possuem em suas formulações outros princípios ativos combinados com a DIP. Neste caso, o grupo-alvo dos analitos a serem determinados foram AA ($pK_a = 4,4$ e $11,2$), CAF ($pK_a = 0,6$ e 14), DIP ($pK_a = -1,2$), MEP ($pK_a = 8,8$), ORF ($pK_a = 8,9$), e ESC ($pK_a = 7,8$). Devido à existência do efeito sinérgico, formulações farmacêuticas contendo DIP na presença de um (DIP + ESC), dois (DIP + CAF + ORF) ou três (DIP + MEP + CAF + AA) destes princípios ativos são comercializados.

De acordo com os seus valores de pK_a , quase todos os compostos (exceto a CAF) podem existir na forma iônica em soluções aquosas, no intervalo de pH comumente utilizado em CZE (pH entre 2 a 12). AA e DIP existem na forma aniônica e, MEP, ORF, e ESC na forma catiônica. A fim de que a análise pudesse ser realizada numa única corrida, uma condição que permite a separação simultânea de cátions e ânions deveria ser explorada. Assim, a estratégia adotada no presente trabalho para a determinação rápida destes compostos usando o sistema regular de CE, foi o uso do fluxo eletrosmótico normal em alta velocidade ($pH \geq 7,5$; coluna capilar de sílica fundida). Nesta condição, cátions são transportados para o detector no modo co-EOF (EOF + velocidade eletroforética) e ânions com baixa mobilidade no modo contra o EOF ($v_{eo} \gg v_{ef}$), sendo detectados após o EOF.

Os primeiros estudos foram realizados utilizando o mesmo BGE usado na primeira parte do trabalho (10 mmol L^{-1} DMX / 20 mmol L^{-1} TRIS), pois para a determinação de CAF é necessário à utilização do DMX como agente complexante. No

entanto, a condutividade apresentada pela solução padrão de AA é semelhante à condutividade desse BGE, gerando um sinal positivo (pico) de baixa intensidade para o AA, dificultando sua determinação. Assim, foi necessária a troca de um dos componentes do tampão.

Na busca de um co-íon que formasse um tampão, no qual tivesse uma melhor sensibilidade para o AA, sem comprometer a sensibilidade para os outros analitos, dois BGEs contendo DMX e com capacidade tamponante em torno de pH 8 foram testados (DMX / HIS e DMX / TEA). Entre estes, o BGE composto por TEA e DMX (pH = 8,5) apresentou um melhor desempenho com aumento na sensibilidade do método em relação ao AA. É importante salientar que o tampão de corrida composto por TEA/DMX sempre foi preparado da seguinte forma: a concentração usada de DMX era previamente definida e o pH da solução era acertado em 8,5 com a adição de TEA na solução. As Figura 26, 27 e 28 apresentam os eletroferogramas obtidos com o sistema CE-C⁴D em função de duas concentrações diferentes DMX (10 e 20 mmol L⁻¹), ambas com pH acertado em 8,5 com adição de TEA.

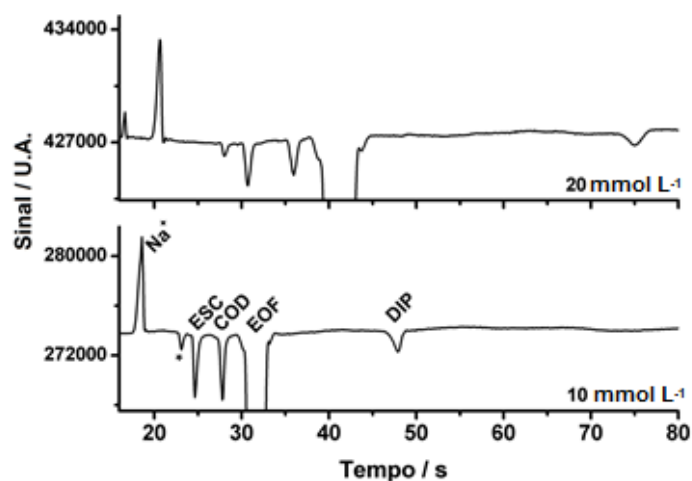


Figura 26 - Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em função das concentrações do BGE composto por DMX (10 e 20 mmol L^{-1}) com pH acertado em $8,5$ com adição de TEA. Demais condições: (IS) Codeína $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$; comprimento efetivo do capilar: 10 cm ; diferença de potencial aplicada: 25 kV ; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $0,5 \text{ s}$; diâmetro interno do capilar: $50 \mu\text{m}$.

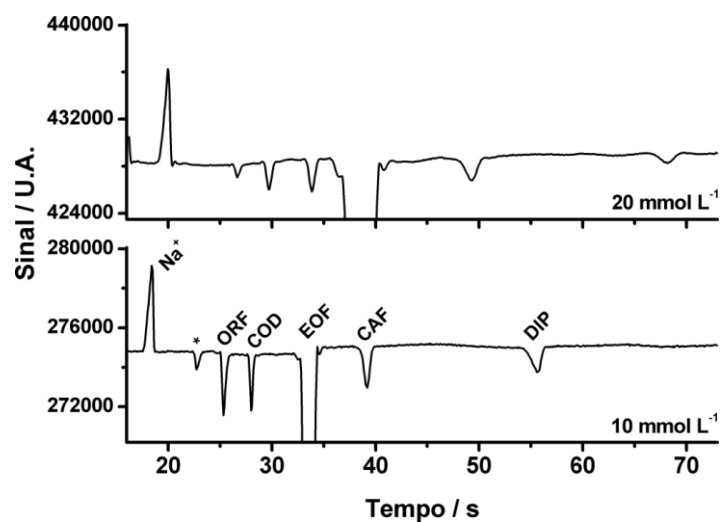


Figura 27 - Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) em função das concentrações do BGE composto por DMX (10 e 20 mmol L^{-1}) com pH acertado em $8,5$ com adição de TEA. Demais condições, vide Figura 26.

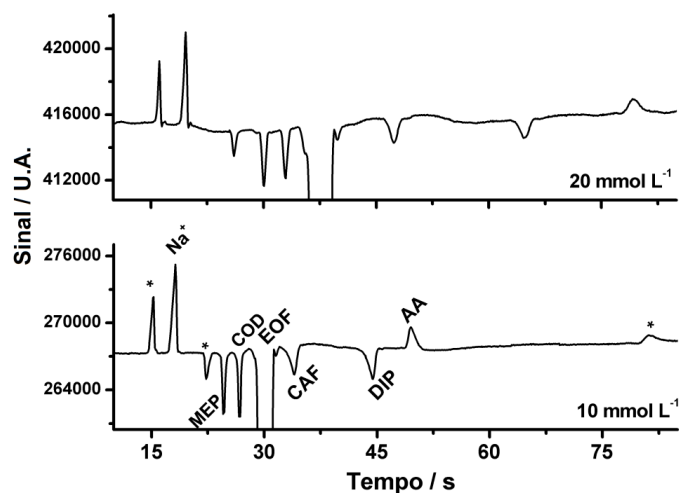


Figura 28 - Eletroferogramas obtidos para uma solução padrão contendo MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e AA (2 mmol L^{-1}) em função das concentrações do BGE composto por DMX (10 e 20 mmol L^{-1}) com pH acertado em 8,5 com adição de TEA. Demais condições, vide Figura 26.

Nota-se que, o BGE composto por 12 mmol L^{-1} de TEA e 10 mmol L^{-1} de DMX, apresentou maior velocidade de análise, boa estabilidade de linha base e boa resolução entre os picos, e, portanto, esta concentração foi adotada nos estudos posteriores. Um fenômeno que pode ser observado nas Fig. 26, 27 e 28 é que as espécies químicas ESC, ORF e MEP apresentam tempos de migração muito semelhantes, não sendo possível a determinação destas espécies quando presentes na mesma solução ou amostra (provável co-migração), usando as condições utilizadas no presente trabalho. No entanto, segundo o nosso conhecimento, estes compostos não estão presentes simultaneamente em formulações farmacêuticas comerciais. Logo, o método utilizando CE- C^4D e o tampão de corrida aqui proposto pode ser utilizado no controle de qualidade das amostras de composição diferentes representadas nas Figuras 26 (ESC + DIP), 27 (ORF + CAF + DIP) e 28 (MEP + CAF + DIP + AA). Dessa forma, optamos por efetuar estudos de otimização independentes, em épocas diferentes e para cada tipo de amostra. Pequenas

variações nos tempos de migração para a mesma espécie são justificáveis devido à realização dos estudos em épocas diferentes, devido a prováveis e pequenas variações no tamanho da coluna capilar (40 ± 3) ou mesmo no tempo de uso de cada capilar.

A Figura 29 apresenta eletroferogramas de soluções padrões contendo (A) ESC e DIP ($0,75$ e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), (B), ORF, CAF e DIP ($0,75$, $1,5$ e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), e (C) MEP, CAF, DIP, e AA ($0,75$, $1,5$, $1,5$, $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente). Eletroferogramas que representam as soluções de amostras farmacêuticas (adequadamente diluídas em água) com uma composição semelhante à das soluções padrão também são apresentados na Figura 29. Em todos os eletroferogramas, COD ($0,70 \text{ mmol L}^{-1}$) foi usada como um padrão interno (IS).

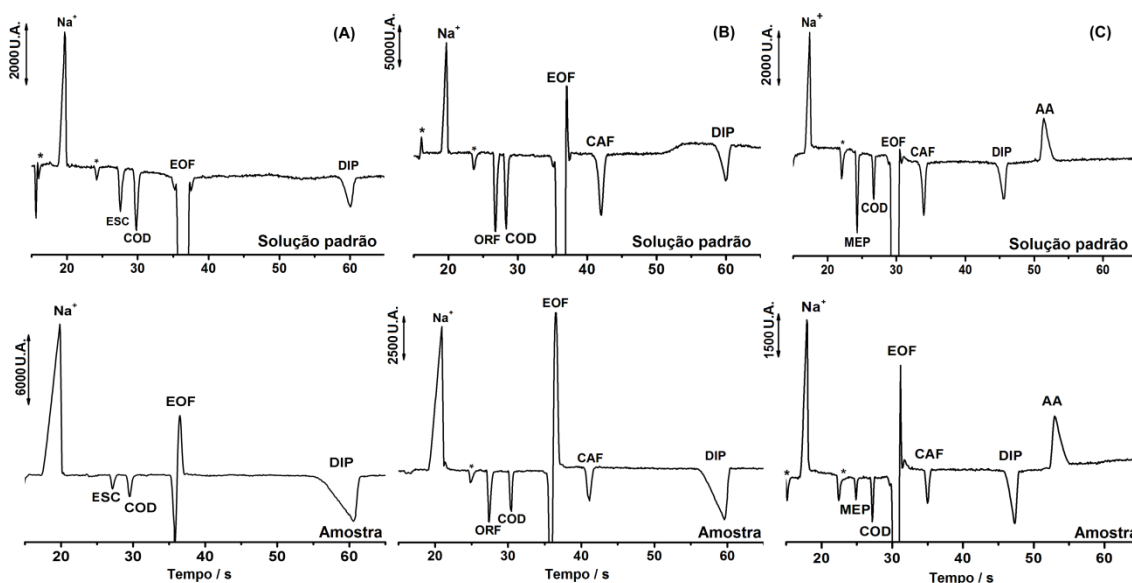


Figura 29 – Eletroferogramas obtidos para soluções padrões contendo (A) ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$); (B) ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada); (C) MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) e AA ($2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Eletroferogramas para soluções amostras com composição similares também são apresentados. COD (IS) $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ foi adicionado em cada solução; BGE: 12 mmol L^{-1} TEA / 10 mmol L^{-1} DMX. Demais condições vide figura 26.

Como pode ser observado, os eletroferogramas das soluções amostra e padrão são similares, o que permite concluir que é possível a determinação rápida e simultânea de DIP e ESC, ou, DIP, CAF e ORF, ou ainda, DIP, CEP, CAF e AA, utilizando o sistema CE-C⁴D proposto. Picos de origem desconhecida (*) estão presentes em algumas soluções, mas é provável que os mesmos não interfiram na determinação dos princípios ativos.

Os efeitos do potencial de separação (de 15 a 25 kV) (Figuras 30, 31 e 32) e do tempo de injeção hidrodinâmica (0,3 - 1,5 s) (Figuras 33, 34 e 35) também foram estudados a fim de obter as melhores condições instrumentais nos experimentos utilizando CE-C⁴D.

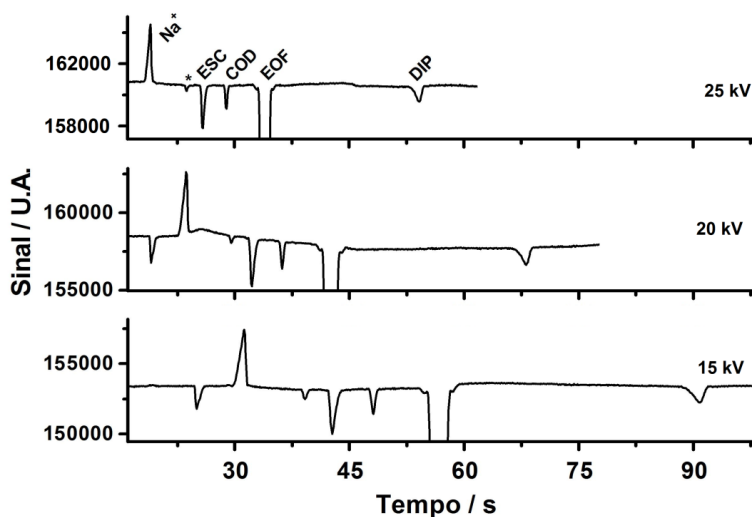


Figura 30 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25kV). Demais condições vide figura 29.

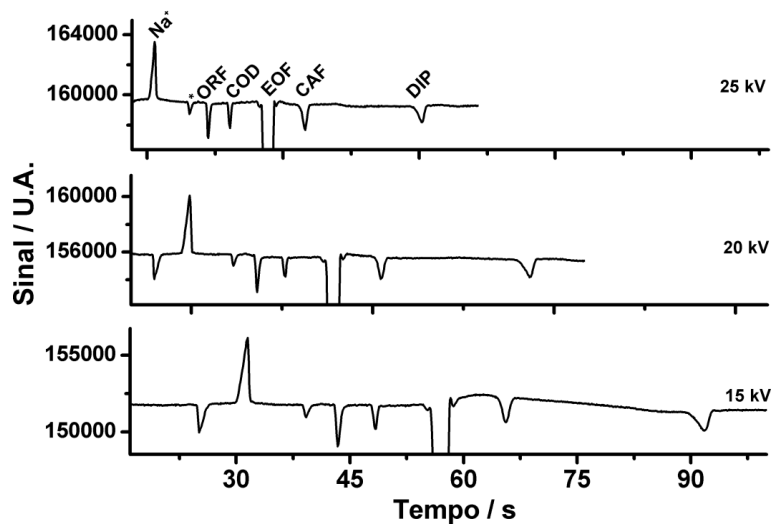


Figura 31 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo ORF (0,75 mmol L⁻¹), CAF e DIP (1,5 mmol L⁻¹ cada) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25 kV). Demais condições vide figura 29.

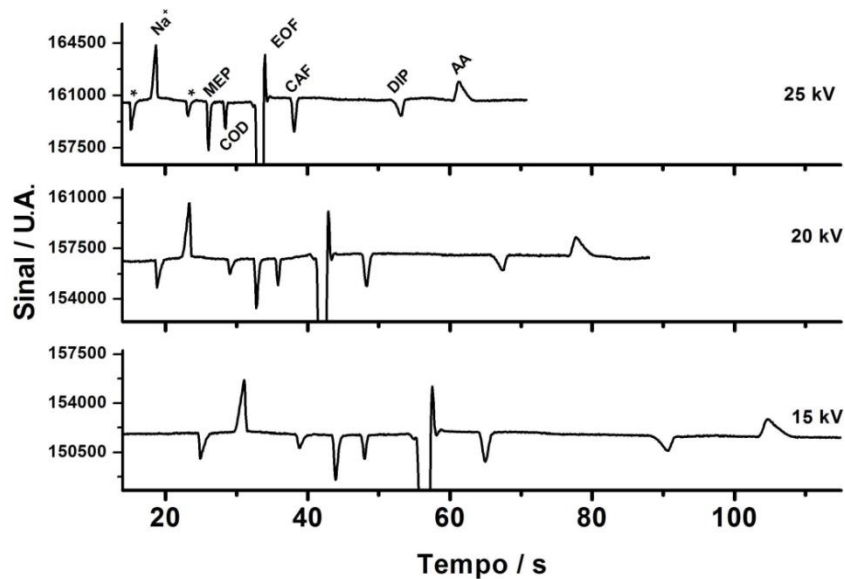


Figura 32 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo MEP (0,75 mmol L⁻¹), CAF e DIP (1,5 mmol L⁻¹ cada) e AA (2 mmol L⁻¹) usando três potenciais de separação distintos (15, 20 e 25 kV). Demais condições vide figura 29.

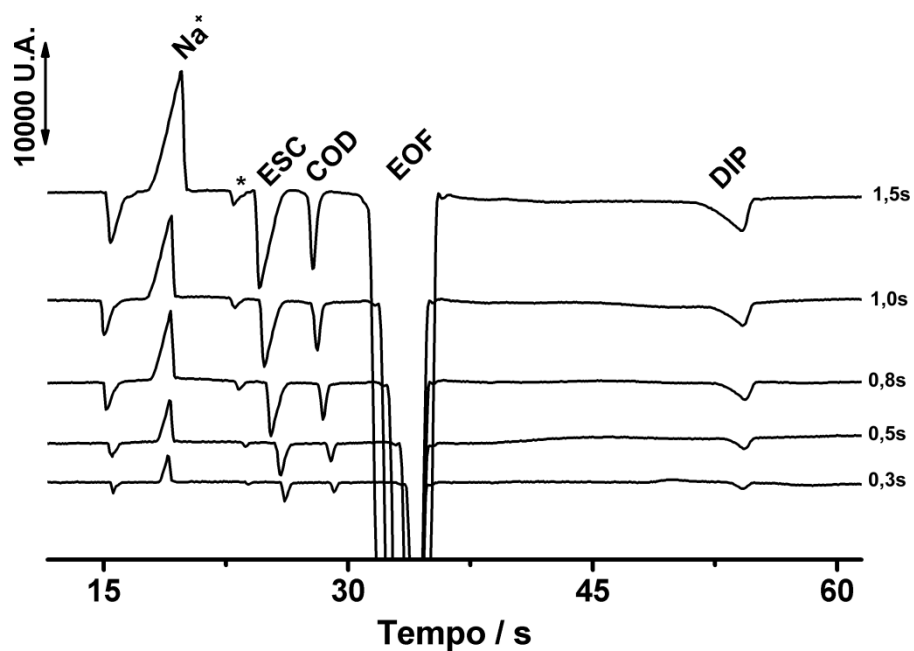


Figura 33 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo ESC ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$). Pressão constante de injeção: 25 kPa; demais condições experimentais vide figura 29.

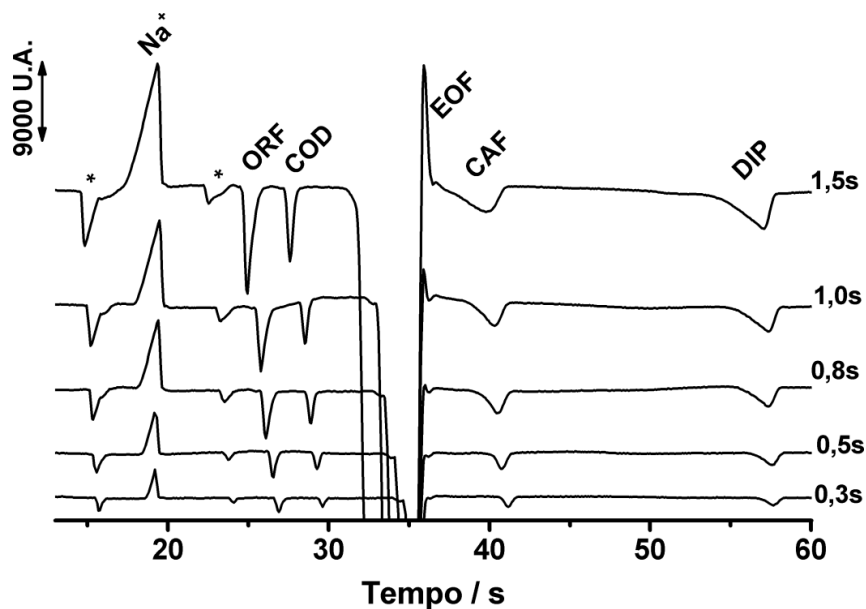


Figura 34 – Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo ORF ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada). Pressão constante de injeção: 25 kPa; demais condições experimentais vide figura 29.

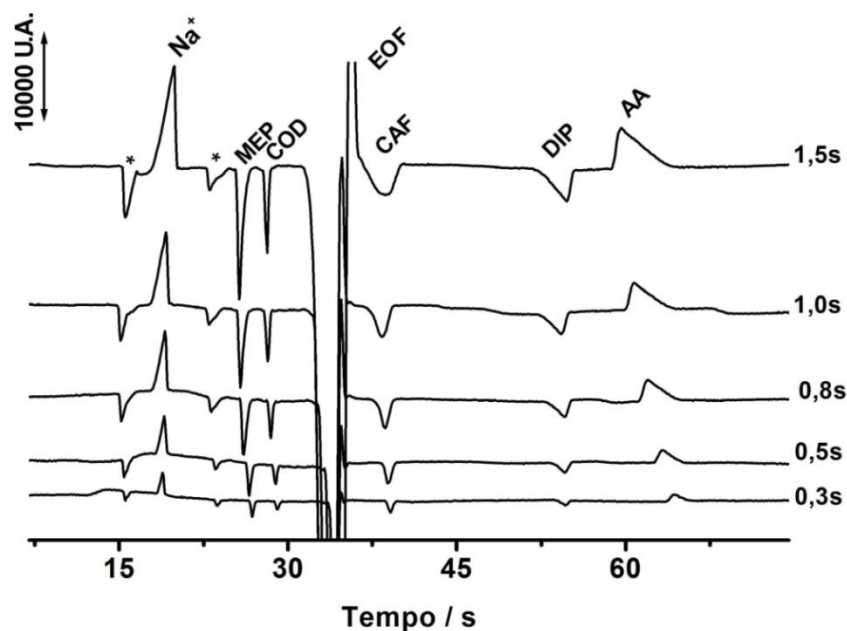


Figura 35 - Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos com solução padrão contendo MEP ($0,75 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) e AA (2 mmol L^{-1}). Pressão constante de injeção: 25 kPa ; demais condições experimentais vide figura 29.

Pode-se observar que o potencial mais elevado possibilitou maior rapidez na análise aliada a uma resolução adequada entre os picos. No caso do tempo de injeção, tem-se um aumento na sensibilidade de todas as espécies com o aumento do tempo de injeção, no entanto, a resolução entre a CAF e o EOF (Fig. 34 e 35) tende a piorar dificultando a determinação precisa da mesma. Após estes estudos, o potencial aplicado de 25 kV e o tempo de injeção de $0,5 \text{ s}$ (25 kPa) propiciou o melhor compromisso em termos de resolução, relação sinal-ruído (SNR) e frequência analítica.

Na etapa seguinte, a precisão dos métodos propostos foi avaliada por dez injeções consecutivas de soluções padrão contendo composições semelhantes às três amostras disponíveis comercialmente (Figura 36). Os resultados obtidos para cada uma das soluções padrão no mesmo dia e com o mesmo comprimento da coluna capilar

foram considerados precisão intra-dia ($n=10$) e os resultados obtidos para cada solução padrão em dias diferentes e com diferentes comprimentos de coluna (40 ± 3 cm) foram considerados precisão inter-dia ($n=3$). A Tabela 4 mostra os resultados obtidos.

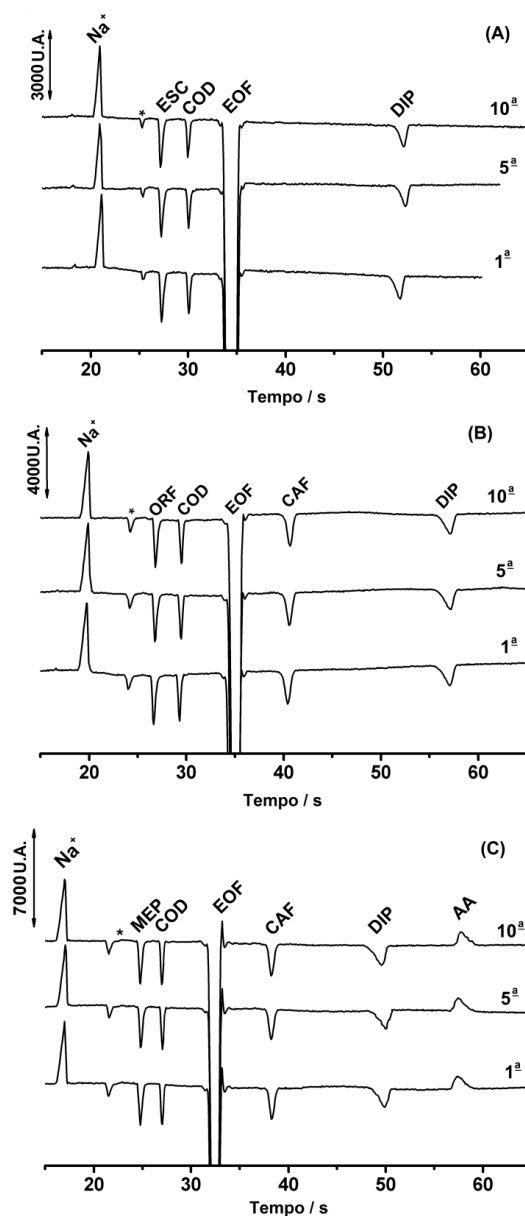


Figura 36 – Eletroferogramas obtidos para injeções sucessivas ($n = 10$) de soluções padrões contendo (A) ESC + DIP ($0,75$ e $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), (B) ORF + CAF + DIP ($0,75$, $1,50$, e $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente), e (C) MEP, CAF, DIP + AA ($0,75$, $1,50$, $1,50$, and $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente). Para outras condições vide Figura 29.

Tabela 4 – Precisões intra-dia (média \pm SD; n = 10) e inter-dia (média \pm SD; n = 3) dos métodos propostos.

Amostra	Analito	Tempo de migração		Área do Pico		Resolução ^a	
		(s)					
		Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia	Intra-dia	Inter-dia
1	SCO	27,1 \pm 0,3	27,7 \pm 0,5	1,57 \pm 0,03	1,49 \pm 0,12	1,51 \pm 0,06	1,54 \pm 0,10
	DIP	52,1 \pm 0,5	57,1 \pm 2,5	1,28 \pm 0,02	1,41 \pm 0,16	6,10 \pm 0,21	6,74 \pm 0,35
2	ORP	26,8 \pm 0,1	26,9 \pm 0,1	1,42 \pm 0,05	1,38 \pm 0,15	1,73 \pm 0,08	1,72 \pm 0,13
	CAF	40,7 \pm 0,2	41,7 \pm 0,4	1,58 \pm 0,03	1,70 \pm 0,10	2,07 \pm 0,05	2,05 \pm 0,10
	DIP	57,1 \pm 0,4	59,5 \pm 1,1	1,50 \pm 0,05	1,34 \pm 0,08	6,83 \pm 0,23	7,02 \pm 0,31
3	MEP	24,7 \pm 0,3	24,6 \pm 0,3	1,17 \pm 0,02	1,59 \pm 0,06	1,95 \pm 0,10	1,87 \pm 0,25
	CAF	38,2 \pm 0,4	35,6 \pm 1,4	1,38 \pm 0,03	1,52 \pm 0,12	2,45 \pm 0,18	2,23 \pm 0,33
	DIP	49,6 \pm 0,7	43,6 \pm 4,1	1,42 \pm 0,04	1,59 \pm 0,22	5,39 \pm 0,34	4,95 \pm 0,50
	AA	57,7 \pm 1,1	53,4 \pm 2,2	1,16 \pm 0,05	1,10 \pm 0,06	2,80 \pm 0,15	2,42 \pm 0,20

Como pode ser observado, baixos valores de desvio padrão foram obtidos em todos os estudos. Em estudos intra-dia, os valores de desvio padrão foram menores do que 2, 4, e 5% para o tempo de migração, área do pico, e resolução, respectivamente. Em estudos inter-dia, os valores de desvio padrão foram menores do que 9, 14, e 15% para o tempo de migração, a área do pico, e resolução, respectivamente. É importante salientar que estes resultados foram obtidos 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 e obtenção de bons resultados nos estudos de repetibilidade intra e inter-dia, um estudo para identificação da faixa linear de resposta das espécies em estudo foi realizado (Figura 37).

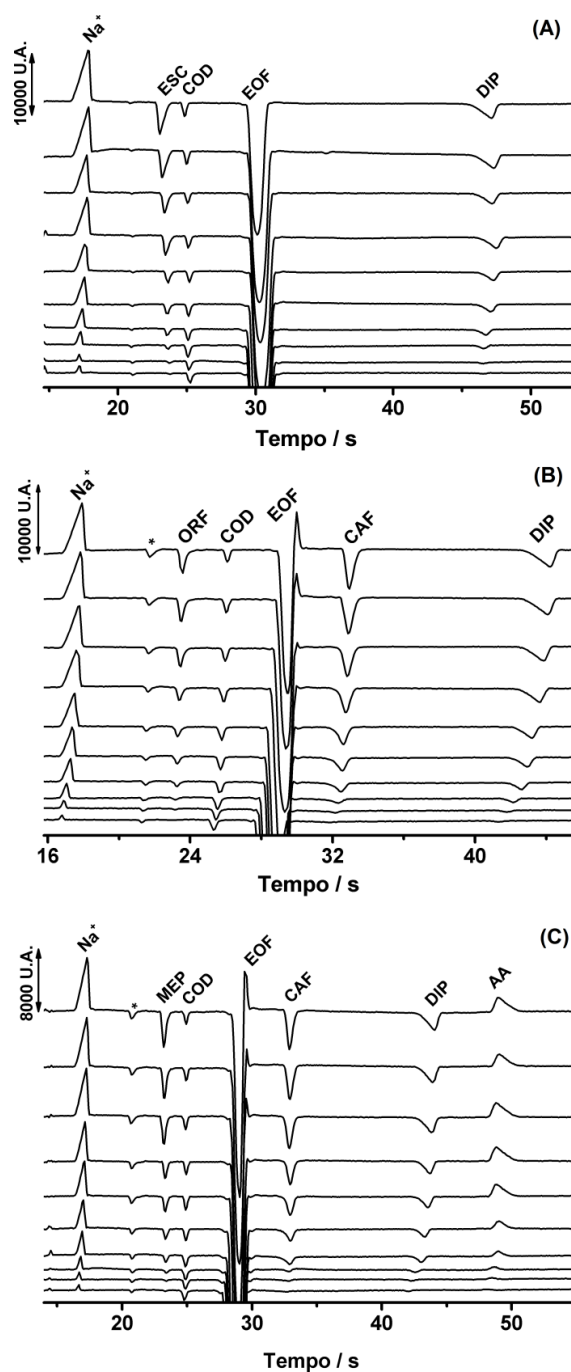


Figura 37 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de soluções padrões contendo concentrações crescentes de (A) ESC ($0,05 - 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,1 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1}$); (B) ORF ($0,05 - 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, e DIP ($0,1 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ cada); (C) MEP ($0,05 - 2,0 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF, DIP ($0,1 - 4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ cada), and AA ($0,25 - 4,5 \text{ mmol L}^{-1}$). COD (IS) $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ foi adicionado em cada solução. Demais condições vide figura 29.

Conforme apresentado na Figura 37, todas as espécies estudadas apresentaram resposta linear entre concentração e condutividade em toda a faixa de concentração estudada ($R > 0,988$ em todos os casos). A resolução entre os picos também continuou sendo adequada. Dentre a faixa linear obtida para cada espécie, Um intervalo de concentração menor foi usado na construção das curvas de calibração para cada espécie. As Figura 38, 39 e 40 apresentam os eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ESC e DIP (Figura 38), ORF, CAF e DIP (Figura 39) e MEP, CAF, DIP E AA (Figura 40), e suas respectivas curvas de calibração.

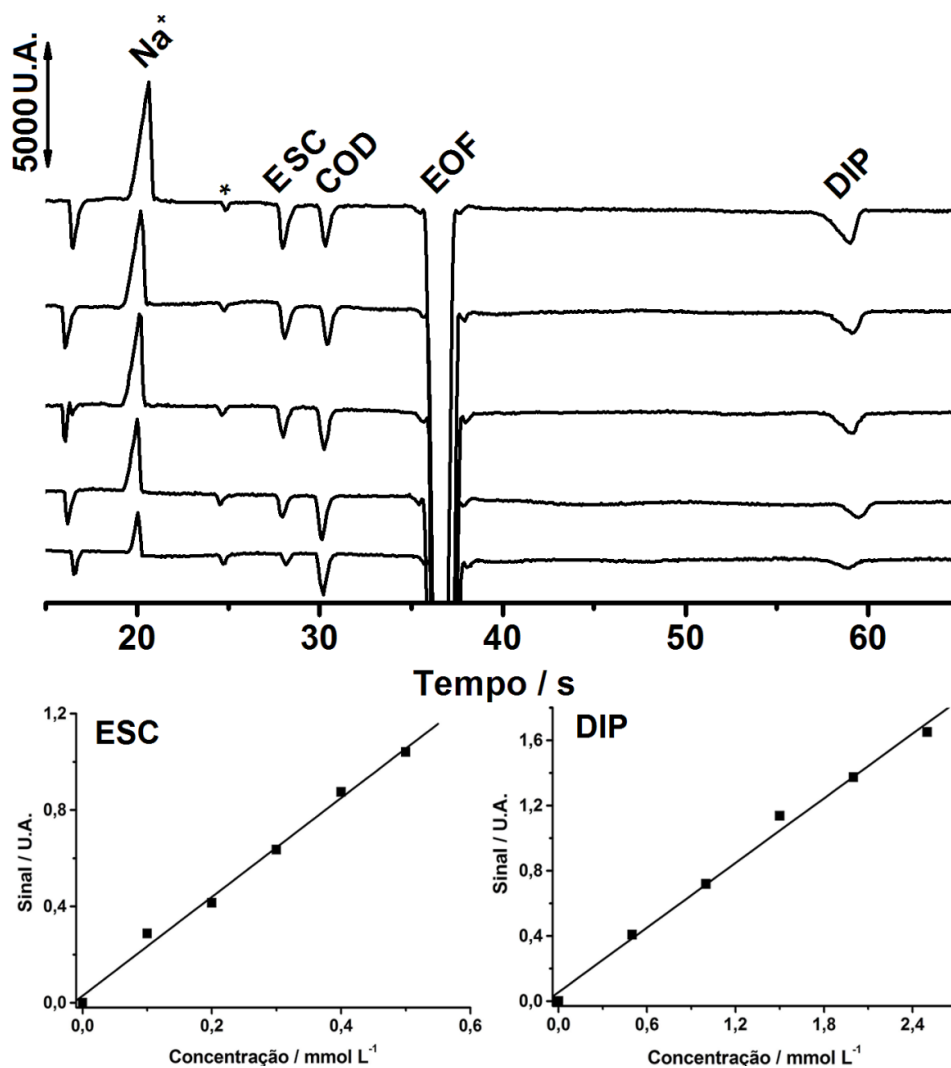


Figura 38 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ESC ($0,1 - 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,5 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. COD foi usado como IS ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Demais condições vide Figura 29.

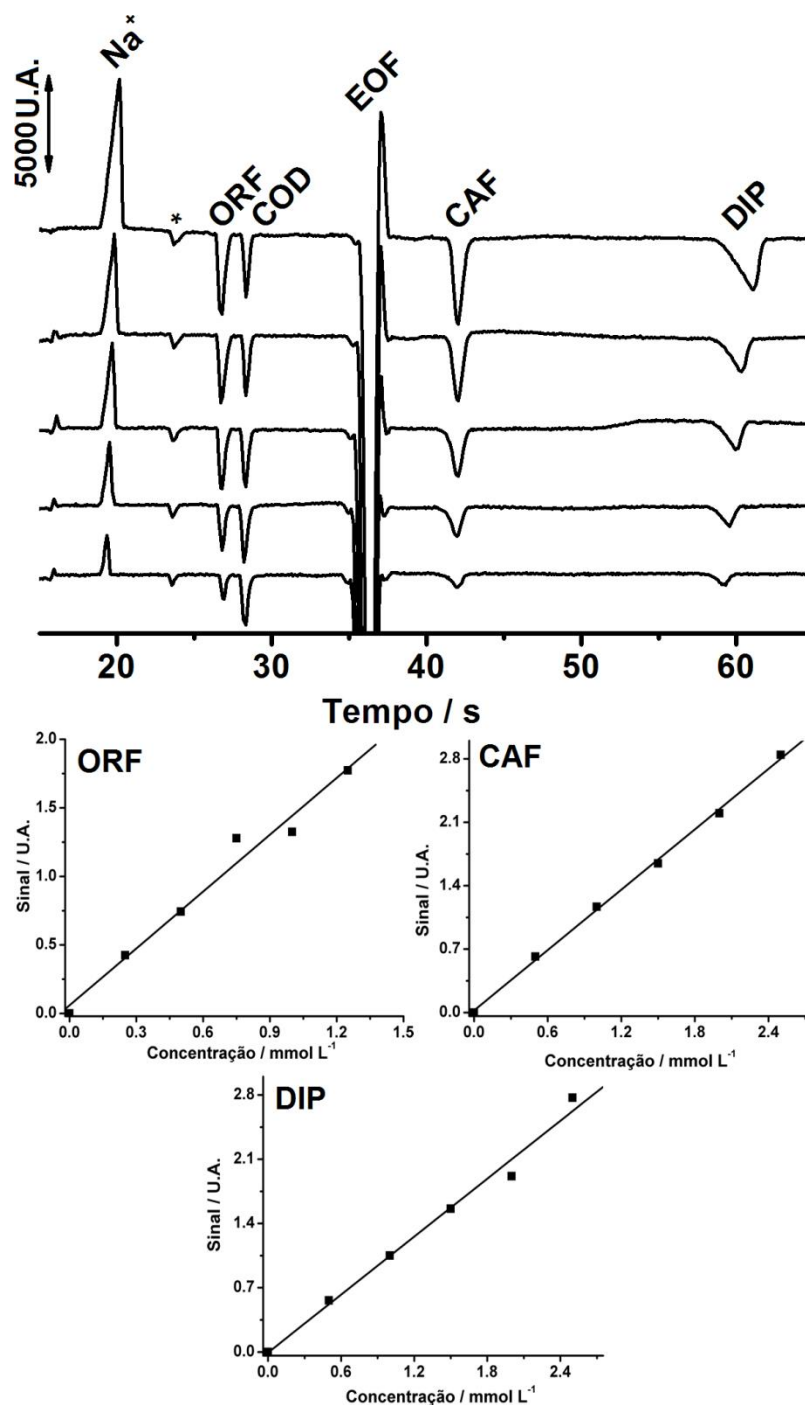


Figura 39 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ORF (0,25 – 1,25 mmol L⁻¹), CAF e DIP (0,5 – 2,5 mmol L⁻¹) e suas respectivas curvas de calibração. COD foi usado como IS (0,7 mmol L⁻¹). Demais condições vide Figura 29.

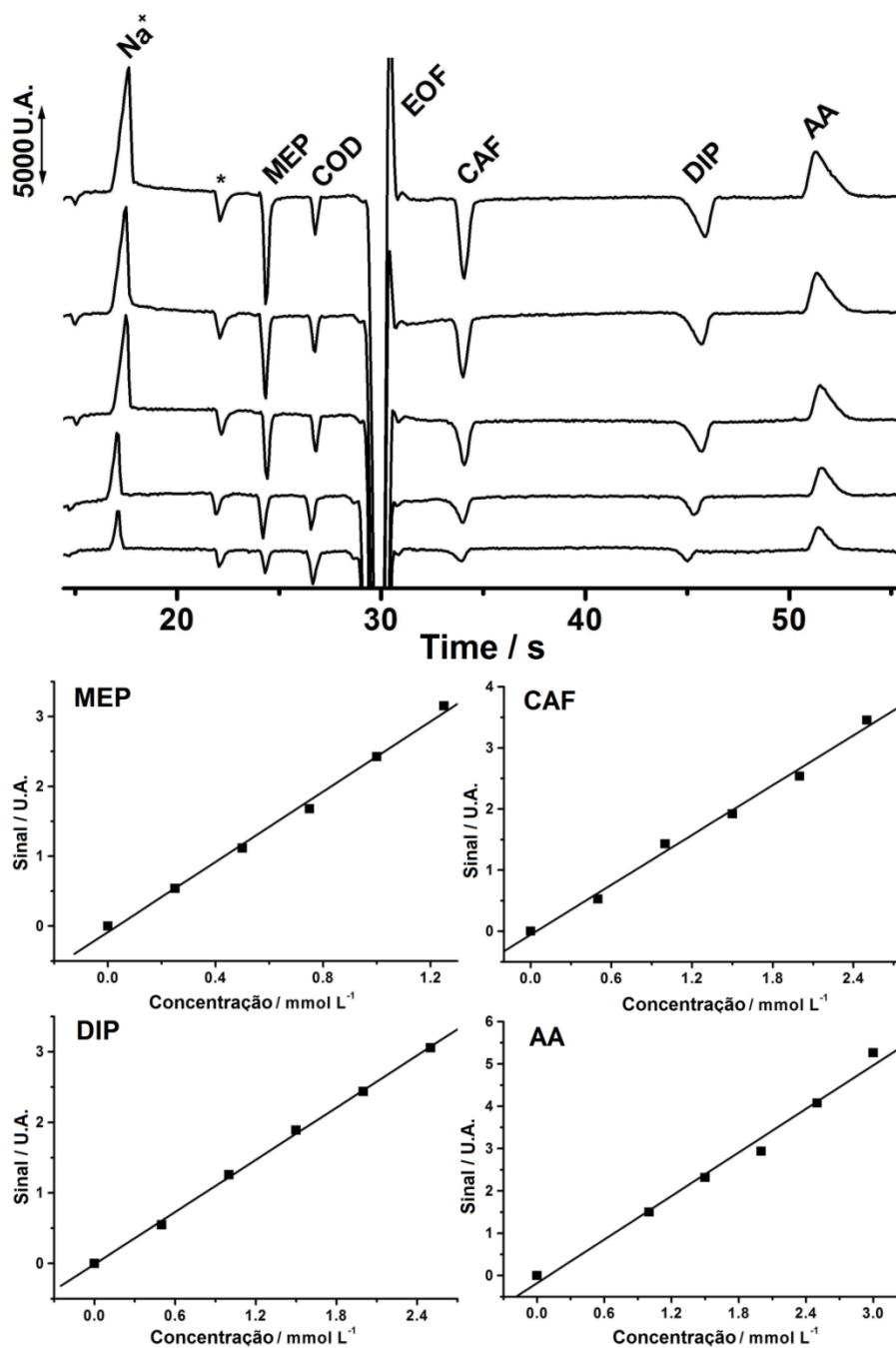


Figura 40 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de MEP ($0,25 - 1,25 \text{ mmol L}^{-1}$), CAF e DIP ($0,5 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), AA ($1,0 - 3,0 \text{ mmol L}^{-1}$), e suas respectivas curvas de calibração. COD foi usado como IS ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$). Demais condições vide Figura 29.

As características analíticas obtidas a partir dos resultados apresentados nas Figuras 38, 39 e 40 são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características analíticas do método proposto.

Analitos	Faixa Linear (mmol L⁻¹)	r	LOD^a (mmol L⁻¹)	LOQ^b
ESC	0,10-0,50	0,997	0,02	0,10
DIP	0,50-2,50	0,998	0,05	0,16
ORF	0,25-1,25	0,995	0,03	0,10
CAF	0,50-2,50	0,998	0,06	0,19
MEP	0,25-1,25	0,998	0,03	0,10
AA	1,00-3,00	0,993	0,07	0,21

^a Limite de detecção (S/N=3); ^b Limite de quantificação (S/N=10).

Observou-se uma boa linearidade para todos os analitos em suas respectivas faixas de concentração ($r > 0,993$). Além disso, os limites de detecção obtidos podem ser considerados adequados para a análise de amostras de formulações farmacêuticas, uma vez que os baixos limites de detecção não são necessários para evitar a diluição excessiva das amostras (uma possível fonte de erro). A Tabela 6 mostra os resultados obtidos com os respectivos desvios padrão ($n = 3$) para a análise de três amostras de medicamentos.

Tabela 6 – Concentração dos analitos em três amostras farmacêuticas obtidas por CE-C⁴D (n = 3).

Amostras	Analitos	Bula	CE-C ⁴ D	Erro
		(mg)	(mg)	
1	ESC	10	9,4 ± 0,4	-6%
	DIP	250	253 ± 5	+1%
	ORF	35	36 ± 1	+3%
2	CAF	50	49 ± 2	-2%
	DIP	300	307 ± 6	+2%
	MEP	10	9,2 ± 0,4	-8%
3	CAF	50	49 ± 2	-2%
	DIP	300	286 ± 5	-5%
	AA	300	294 ± 6	-2%

Erro: $100 \times (\text{CE-C}^4\text{D} - \text{bula}) / \text{bula}$

Como pode ser observado, os resultados obtidos foram semelhantes aos relatados na bula (valores do rótulo) e sugerem que a composição das amostras farmacêuticas estavam corretas.

Além disso, a fim de avaliar a exatidão dos métodos propostos, testes de adição e recuperação usando amostras farmacêuticas também foram realizados. Neste estudo, as amostras foram diluídas adequadamente e analisadas sem e com a adição de 0,20; 0,50 ou 1,00 mmol L⁻¹ de cada analito. Os valores de recuperação das amostras fortificadas são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (n = 3).

Amostra	Analitos	Analisada (mmol L ⁻¹)	Adicionada (mmol L ⁻¹)	Encontrada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
1	ESC	0,19 ± 0,01	0,20	0,37 ± 0,02	95 ± 4
	DIP	1,01 ± 0,02	1,00	1,87 ± 0,08	93 ± 4
2	ORF	0,52 ± 0,02	0,50	1,04 ± 0,02	102 ± 2
	CAF	0,99 ± 0,04	1,00	2,05 ± 0,08	103 ± 4
	DIP	1,02 ± 0,02	1,00	1,90 ± 0,12	94 ± 6
3	MEP	0,46 ± 0,02	0,50	0,92 ± 0,04	96 ± 4
	CAF	0,98 ± 0,04	1,00	1,92 ± 0,10	97 ± 5
	DIP	0,95 ± 0,02	1,00	1,85 ± 0,08	95 ± 4
	AA	1,38 ± 0,03	1,00	2,19 ± 0,12	92 ± 5

Recuperação: Valor encontrado / (Valor analisado + Valor adicionado) × 100

Valores de recuperação entre 95% e 103% foram obtidos para a maioria dos analitos, o que indica a ausência de interferência da matriz e podem ser considerados resultados adequados para amostras farmacêuticas. No entanto, valores de recuperação menores que 95% foram obtidos para DIP e AA. Isso provavelmente ocorreu porque ambos os compostos sofrem facilmente hidrólise ou degradação em soluções aquosas.

4.2.1- Conclusões parciais

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o método proposto usando CE-C⁴D permite a determinação rápida de DIP na presença de cinco princípios

ativos (ESC, ORF, MEP, CAF e AA) presentes em formulações farmacêuticas comerciais. Segundo o nosso conhecimento, o método proposto para separar e quantificar todos estes compostos é inédito.

5 – Conclusões gerais e perspectivas futuras

Com base nos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que o sistema CE-C⁴D fornece características vantajosas para a determinação simultânea de CAF, DIP e AAS, assim como os produtos de degradação da DIP (metilamina e hidroximetanosulfonato) e AAS (ácido salicílico). Adicionalmente, características vantajosas também foram demonstradas para a determinação de DIP na presença de outros princípios ativos, como ESC, CAF, ORF, MEP e AA.

Como principais características dos métodos propostos podemos citar o baixo custo de análise, alta frequência analítica (eletroferogramas obtidos em menos de 1 min), consumo mínimo de amostras e reagentes e consequente geração mínima de resíduos, precisão semelhante à cromatografia líquida, possibilidade de determinação simultânea de cátions e ânions (determinação estequiométrica) e detecção de produtos de degradação.

No entanto, os métodos propostos também apresentam desvantagens. O C⁴D é um detector universal e, portanto, apresenta limitações na análise rápida de amostras complexas (urina ou sangue), pois, em média, todos os compostos tendem a ser detectados e co-migrações podem ser comuns. Além disso, uma menor sensibilidade é geralmente obtida para analitos com mobilidades (condutividade) intermediários.

Em relação à determinação rápida e simultânea de CAF, DIP, AAS e AS, a estratégia apropriada foi à utilização do BGE composto por 20 mmol L⁻¹ TRIS e 10 mmol L⁻¹ DMX (pH = 8,4). Esta estratégia proporcionou a separação e determinação dos quatro analitos em menos de 1 minuto com obtenção de informações adicionais sobre a estequiometria do sal de dipirona (NaDIP) e do grau de degradação tanto na matéria prima como em formulações farmacêuticas. A frequência analítica obtida neste trabalho foi o grande diferencial em relação à apresentada pelo método recomendado como padrão.

O BGE composto por 12 mmol L⁻¹ TEA e 10 mmol L⁻¹ DMX (pH = 8,5) demonstrou ser o mais apropriado para a determinação rápida (cerca de 1 minuto) de DIP na presença de outros princípios ativos. Também é possível obter informações adicionais sobre a estequiometria do sal de DIP, desde que não tenha à adição de excipientes contendo sódio em formulações comerciais, senão, este procedimento somente permite obter informações sobre a estequiometria do sal na matéria prima. O método não possibilitou a determinação simultânea de todos os princípios ativos, pelo fato de ESC, ORF e MEP terem mobilidades muito similares, não permitindo a efetiva separação.

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 às formulações farmacêuticas contendo hidroclorotiazida na presença de outros ingredientes ativos.

6 – Referências bibliográficas

1. Heiger, D.N., *High Performance Capillary Electrophoresis: An introduction*. Hewlett Packard Company, **1997**. Publication Number 12-5091-6199E.
2. Tiselius, A., *The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins*. Tese de Doutorado, University of Uppsala, Suécia, **1930**.
3. Tavares, M.F.M., *Eletroforese Capilar: Conceitos básicos*. Química Nova, **1996** 19(2): p. 173-181.
4. Hjérten, S., *Free zone electrophoresis*. Chromatographic Reviews, **1967** 9(2): p. 122-219.
5. Hjérten, S., *High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, **1983** 270(0): p. 1-6.
6. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M, Verheggen, P.E.M., *Concentration distributions in free zone electrophoresis*. Journal of Chromatography, **1979** 169(FEB): p. 1-10.
7. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, T., *High-performance zone electrophoresis*. Journal of Chromatography, **1979** 169(FEB): p. 11-20.
8. Everaerts, F.M., Verheggen, T.P.E.M., Vandevenne, J.L.M., *Isotachophoretic experiments with a counter flow of electrolyte*. Journal of Chromatography, **1976** 123(1): p. 139-148.
9. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*. Analytical Chemistry, **1981** 53(8): p. 1298-1302.
10. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Capillary zone electrophoresis*. Science, **1983** 222(4621): p. 266-272.
11. Terabe, S., Otsuka K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries*. Analytical Chemistry, **1984** 56(1): p. 111-113.

12. Bockel, W.J., Martini, E.M.A., Samios, D., Piatnicki, C.M.S., *A laboratory-made capillary electrophoresis equipment with conductometric detection*. Química Nova, **2005** 28(6): p. 1106-1110.
13. Thangadurai, S., *The Human Genome Project: the role of analytical chemists*. Analytical Sciences, **2004** 20(4): p. 595-601.
14. Kuban, P., Hauser, P.C., *A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection*. Analytica Chimica Acta, **2008** 607(1): p. 15-29.
15. Queiroz, S.C.N., Jardim, I.C.S.F., *Eletroforese Capilar*. Chemkeys, **2001**.
16. Skoog, D.A. Holler, F.J., Nieman, T. A., *Principles of Instrumental Analysis*. 5 ed, **1998**.
17. Carvalho, A.Z., *Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato à determinação de espécies neutras*. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2003**.
18. da Silva, J.A.F, Coltro, W.K.T., Carrilho, E., Tavares, M.F.M., *Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares*. Química Nova, 2007 **30**(3): p. 740-744.
19. da Silva, J.A.F., *Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocinética*. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2001**.
20. Bard, A.J., Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods*. John Wiley & Sons, New York, **1980**.
21. Baker, D.R., *Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Sons, New York, **1995**.
22. Bello, M.S., Capelli, L., Righetti, P.G., *Dependence of the electroosmotic mobility on the applied electric-field and its reproducibility in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **1994** 684(2): p. 311-322.

23. Hayes, M.A., *Extension of external voltage control of electroosmosis to high-pH buffers*. Analytical Chemistry, **1999** 71(17): p. 3793-3798.
24. Cunha, R.R., *Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE- C^4D)*. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, **2012**.
25. Zanolli filho, L.A., *Desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de qualidade de anti-retrovirais em medicamentos utilizando eletroforese capilar*. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2007**.
26. Colombara, R., Tavares, M.F.M., Massaro, S., *Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações*. Química Nova, **1997** 20 (5): p. 512-518.
27. de Jesus, D.P., Brito-Neto, J.G.A., Richter, E.M., Angnes, L., Gutz, I.G.R., do Lago, C.L., *Extending the lifetime of the running electrolyte in capillary electrophoresis by using additional compartments for external electrolysis*. Analytical Chemistry, **2005** 77(2): p. 607-614.
28. Chang, H.T., Yeung, E.S., *Dynamic control to improve the separation performance in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, **1995** 16(11): p. 2069-2073.
29. Kasicka, V., Prusik, Z., Sazelova, P., Brynda, E., Stejskal, J., *Capillary zone electrophoresis with electroosmotic flow controlled by external radial electric field*. Electrophoresis, **1999** 20(12): p. 2484-2492.
30. McGuffin, V.L., Tavares, M.F.M., *Computer-assisted optimization of separations in capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, **1997** 69(2): p. 152-164.
31. Tavares, M.F.M., McGuffin, V.L., *Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **1994** 686(1): p. 129-142.

32. Tavares, M.F.M., *Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar*. Química Nova, **1997** 20(5): p. 493-511.
33. Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., *Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary*. Analytical Chemistry, **1985** 57(4): p. 834-841.
34. Szucs, R., Vindevogel, J., Sandra, P., Verhagen, L.C.. *Sample stacking effects and large injection volumes in micellar electrokinetic chromatography of ionic compounds - direct determination of iso-alpha-acids in beer*. Chromatographia, **1993** 36(1): p. 323-329.
35. Landers, J.P., *Handbook of High Performe Capillary Electrophoresis*. CRC Press ed. **1993**.
36. Kato, M., Onda, Y., Sakai-Kato, K., Toyo'oka, T., *Simultaneous analysis of cationic, anionic, and neutral compounds using monolithic CEC columns*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2006** 386(3): p. 572-577.
37. Adu, J.K., Lau, S.S., Watson, D.G., Euerby, M.R., Skellern, G.G., Tettey, J.N.A., *Capillary electrochromatography of therapeutic peptides on mixed-mode butylmethacrylate monoliths*. Electrophoresis, **2005** 26(18): p. 3445-3451.
38. Albin, M., Grossman, P.D., Moring, S.E., *Sensitivity enhancement for capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, **1993** 65(10): p. A489-A497.
39. Haber, C., *handobook of capillary electrophoresis*. 2 ed, **1997**.
40. Zemann, A.J., *Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, **2003** 24(12-13): p. 2125-2137.
41. Henderson, R.K., Baker, A., Murphy, K.R., Hambly, A., Stuetz, R.M., Khan, S.J., *Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review*. Water Research, **2009** 43(4): p. 863-881.
42. Mark, J.J.P., Scholz, R., Matysik, F.M., *Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **2012** 1267(7): p. 45-64.

43. Sisk, G.D., Herzog, G., Glennon, J.D., Arrigan, D.W.M., *Assessment of ion transfer amperometry at liquid-liquid interfaces for detection in CE. Electrophoresis*, **2009** 30(19): p. 3366-3371.
44. Silva, J.A.F., *Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. Química Nova*, **2003** 26(1): p. 56-64.
45. Sonlinova, V., Kasicka, V., *Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis. Journal of Separation Science*, **2006** 29(12): p. 1743-1762.
46. Gas, B., Demjanenko, M., Vacik, J., *High-frequency contactless conductivity detection in isotachophoresis. Journal of Chromatography*, **1980** 192(2): p. 253-257.
47. Zemmann, A.J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G.K., *Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Analytical Chemistry*, **1998** 70(3): p. 563-567.
48. da Silva, J.A.F., do Lago, C.L., *An oscillometric detector for capillary electrophoresis. Analytical Chemistry*, **1998** 70(20): p. 4339-4343.
49. Huang, X., Pang, T.K.J., Gordon, M.J., Zare, R.N., *On-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis. Analytical Chemistry*, **1987** 59(23): p. 2747-2749.
50. Huang, X., Zare, R.N., Sloss, S., Ewing, A.G., *End-column detection for capillary zone electrophoresis. Analytical Chemistry*, **1991** 63(2): p. 189-192.
51. Huang, X.H., Zare, R.N., *Improved end-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis. Analytical Chemistry*, **1991** 63(19): p. 2193-2196.
52. da Silva, J.A.F., do Lago, C.L., *Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. Electrophoresis*, **2000** 21(7): p. 1405-1408.
53. Brito-Neto, J.G.A., da Silva, J.A.F., 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.
54. Brito-Neto, J.G.A., da Silva, J.A.F., 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.
 55. Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., Smith, R.D., *Online mass-spectrometric detection for capillary zone electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, **1987** 59(8): p. 1230-1232.
 56. Visky, D., Jimidar, I., Ael, W.V., Vennekens, T., Redlich, D., de Smet, M., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry in impurity profiling of pharmaceutical products*. *Electrophoresis*, **2005** 26(7-8): p. 1541-1549.
 57. Ohnesorge, J., de Griend, C.S.V., Watzig, H., *Quantification in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Long- and short-term variance components and their compensation using internal standards*. *Electrophoresis*, **2005** 26(12): p. 2360-2375.
 58. Crotti, A.E.M., Vessecchi, R., Lopes, J.L.C., Lopes, N. P., *Espectrometria de massa com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular*. *Química Nova*, **2006** 29(2): p. 287-292.
 59. Cech, N.B., Enke, C.G., *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. *Mass Spectrometry Reviews*, **2001** 20(6): p. 362-387.
 60. Macia, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*. *Electrophoresis*, **2004** 25(20): p. 3441-3449.
 61. Moraes, M.C., do Lago, C. L., *Espectrometria de Massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas*. *Química Nova*, **2003** 26(4): p. 556-563.

62. Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A., *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annual Review of Biochemistry, **2001** 70(issue): p. 437-473.
63. Yates, J.R., *Mass spectrometry and the age of the proteome*. Journal of Mass Spectrometry, **1998** 33(1): p. 1-19.
64. Mol, R., de Jong, G. J., Somsen, G.W., *On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance*. Electrophoresis, **2005** 26(1): p. 146-154.
65. Petersen, J.R., Okorodudu, A.O., Mohammad, A., Payne, D.A., *Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory*. Clinica Chimica Acta, **2003** 330(1-2): p. 1-30.
66. Kolch, W., Neusüß, C., Pelzing, M., Mischak, H., *Capillary electrophoresis - Mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery*. Mass Spectrometry Reviews, **2005** 24(6): p. 959-977.
67. Banks, J.F., *Recent advances in capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry*. Electrophoresis, **1997** 18(12-13): p. 2255-2266.
68. Sheppard, R.L., Tong, X., Cai, J., Henion, J.D., *Chiral separation and detection of terbutaline and ephedrine by capillary electrophoresis coupled with ion-spray mass-spectrometry*. Analytical Chemistry, **1995** 67(13): p. 2054-2058.
69. Hofstadler, S.A., Wahl, J.H., Bruce, J.E., Smith, R.D., *Online capillary electrophoresis with fourier-transform ion-cyclotron resonance mass-spectrometry*. Journal of the American Chemical Society, **1993** 115(15): p. 6983-6984.
70. Paulekuhn, G.S., Dressman, J.B., Saal, C., *Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the Orange Book Database*. Journal of Medicinal Chemistry, **2007** 50(26): p. 6665-6672.
71. <http://www2.shimadzu.com/applications/LC/IC%20L387.pdf>, acessado às 17:30h de 10/01/2014.

72. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/87447-PO-IICS-API-Counterion-CAD-18Oct2010-LPN2610-01.pdf>, acessado às 18:00h de 10/01/2014.
73. Mai, T.D., 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.
74. Calisevici, M.N., Perju, D.M., Lysandrou, M.C., Dumitrel, G.A., Glevitzky, M., *Determination of anion and cation contents in Cyprus drinking waters by HPLC method*. Journal of Food Agriculture & Environment, **2011** 9(1): p. 65-68.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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, **ano** 75(1-2): p. 25-32.

81. Priego-Capote, F., de Castro, M.D.L., *Dual injection capillary electrophoresis: Foundations and applications*. Electrophoresis, **2004** 25(23-24): p. 4074-4085.
82. Nehme, R., Lascaux, A., Delépee, 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.
83. 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.
84. 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.
85. Foret, F., Fanali, S., Ossicini, L., Bocek, P., *Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography, **1989** 470(1): p. 299-308.
86. 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.
87. Cunha, R.R., Gimenes, D.T., 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, **ano** 34(9-10): p. 1423-1428.
88. 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.

89. 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.
90. Krokhin, O.V., Hoshino, H., Shpigun, O.A., Yotsuyanagi, 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.
91. Costa, A.C.O., Perfeito, L.S., Tavares, M.F.M., 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.
92. Costa, A.C.O., Costa, J. L., Tonin, F.G., Tavares, M.F.M., Micke, G.A., *Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of creatinine in urine samples*. Journal of Chromatography A, **2007** 1171(1-2): p. 140-143.
93. Zinellu, A., Sotgia, S., Zinellu, E., Chessa, R., Deiana, L., Carru, C., *Assay for the simultaneous determination of guanidinoacetic acid, creatinine and creatine in plasma and urine by capillary electrophoresis UV-detection*. Journal of Separation Science, **2006** 29(5): p. 704-708.
94. Goncalves Filho, L.C., Micke, G.A., *Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **2007** 1154(1-2): p. 477-480.
95. de Rossi, A., Desiderio, C., *Fast capillary electrochromatographic analysis of parabens and 4-hydroxybenzoic acid in drugs and cosmetics*. Electrophoresis, 2002 **23**(19): p. 3410-3417.
96. Lu, C.C., Jong, Y.J., Ferrance, J., Ko, W.K., Wu, S.M., *On-line sample stacking and short-end injection CE for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in plasma: Method development and validation using experimental designs*. Electrophoresis, **2007** 28(18): p. 3290-3295.

97. Micke, G.A., Costa, A.C.O., Heller, M., Barcellos, M., Piovezan, M., Caon, T., de Oliveira, M.A.L., *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.
98. Sotgia, S., Carru, C., Franconi, F., Fiori, P.B., Manca, S., Pettinato, S., Magliona, S., Ginanneschi, R., Deiana, L., Zinellu, A., *Rapid quantification of total genomic DNA methylation degree by short-end injection capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **2008** 1185(1): p. 145-150.
99. Kang, J.W., Wistuba, D., Schurig, V., *Fast enantiomeric separation with vancomycin as chiral additive by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis: Increase of the detection sensitivity by the partial filling technique*. Electrophoresis, **2003** 24(15): p. 2674-2679.
100. Marsh, A., Altria, K., *Use of multiplexed CE for pharmaceutical analysis*. Chromatographia, **2006** 64(5-6): p. 327-333.
101. 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.
102. Matysik, F.M., *Advances in fast electrophoretic separations based on short capillaries*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2010** 397(3): p. 961-965.
103. Moore, T.J., Joseph, M.J., Allen, B.W., Coury, L.A., *Enzymatically amplified voltammetric sensor for microliter sample volumes of salicylate*. Analytical Chemistry, **1995** 67(11): p. 1896-1902.
104. Kibbey, C.E., Park, S.B., DeAdwyler, G., Meyerhoff, M.E., *Further-studies on the potentiometric salicylate response of polymeric membranes doped with tin(IV)-tetraphenylporphyrins*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **1992** 335(1-2): p. 135-149.
105. Akay, C., Degim, I.T., Sayal, A., Aydin, A., Ozkan, Y., Gul, H., *Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms*. Turkish Journal of Medical Sciences, **2008** 38(2): p. 167-173.

106. Roth, G.J., Majerus, P.W., *Mechanism of effect of aspirin on human platelets. 1. Acetylation of a particulate fraction protein.* Journal of Clinical Investigation, **1975** 56(3): p. 624-632.
107. Klaassen, C.D., *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* 5 ed, **1996**.
108. Rowland, M., Riegelman, S., Harris, P.A., Sholkoff, S.D., *Absorption kinetics of aspirin in man following oral administration of an aqueous-solution.* Journal of Pharmaceutical Sciences, **1972** 61(3): p. 379-385.
109. Ho, P.C., Triggs, E.J., Bourne, D.W., Heazlewood, V.J., *The effects of age and sex on the disposition of acetylsalicylic-acid and its metabolites.* British Journal of Clinical Pharmacology, **1985** 19(5): p. 675-684.
110. Cohen, L.S., *Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid.* Seminars in Thrombosis and Hemostasis, **1976** 2(issue): p. 146-175.
111. Burch, J.W., Majerus, P.W., *Role of prostaglandins in platelet-function.* Seminars in Hematology, **1979** 16(3): p. 196-207.
112. Tischio, J.P., *Determination of salicylates by GLC.* Journal of Pharmaceutical Sciences, **1976** 65(10): p. 1530-1533.
113. Kwong, T.C., *Analysis of acetylsalicylic-acid and its metabolites by liquid-chromatography.* Journal of Liquid Chromatography, **1987** 10(2-3): p. 305-321.
114. Okruk, R.J., Adams, M.A., Philp, R.B., *Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic-acid and its metabolites using reversed-phase high-performance liquid-chromatography.* Journal of Chromatography, **1984** 310(2): p. 343-352.
115. Hansen, S.H., Jensen, M.E., Bjornsdottir, I., *Assay of acetylsalicylic acid and three of its metabolites in human plasma and urine using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electroosmotic flow.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **1998** 17(6-7): p. 1155-1160.
116. Kunkel, A., Gunter, S., Watzig, H., *Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment -*

- Improvement of precision.* Journal of Chromatography A, **1997** 768(1): p. 125-133.
117. <http://www.chemicalize.org/>, acessado às 14:30h de 11/12/**2013**.
 118. Miranda, J.A.T.d.M., 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, **2012** 35(issue): p. 1459-1463.
 119. Ergun, H., Frattarelli, D.A.C., Aranda, J.V., *Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2004** 35(3): p. 479-487.
 120. Gomez, M.J., Sirtori, C., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A.R., Aguera, A., *Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products.* Water Research, **2008** 42(10-11): p. 2698-2706.
 121. Kelly, C.A., *Determination of the decomposition of aspirin.* Journal of Pharmaceuticals Sciences, **1970** 59(8): p. 1053-1079.
 122. Botton, P.H., Costa, M.S., Ardais, A.P., Mioranza, S., Souza, D.O., da Rocha, J.B.T., Porciúncula, L.O., *Caffeine prevents disruption of memory consolidation in the inhibitory avoidance and novel object recognition tasks by scopolamine in adult mice.* Behavioural Brain Research, **2010** 214(2): p. 254-259.
 123. Pellerin, F., Letavern, J.F., *Study of stability of sodium noramidopyrimethane sulfonate by gas-chromatography.* Annales Pharmaceutiques Francaises, **1973** 31(3): p. 161-166.
 124. Perez-Estrada, L.A., Malato, S., Aguera, A., Fernandez-Alba, A.R., *Degradation of dipyrone and its main intermediates by solar AOPs Identification of intermediate products and toxicity assessment.* Catalysis Today, **2007** 129(1-2): p. 207-214.
 125. Spataru, N., Sarada, B.V., Tryk, D.A., Fujishima, A., *Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond*

- electrodes and its analytical application*. *Electroanalysis*, **2002** 14(11): p. 721-728.
126. Sawynok, J., *Caffeine and pain*. *Pain*, **2011** 152(4): p. 726-729.
 127. Karim, M.M., Jeon, C.W., Lee, H.S., Alam, S.M., Lee, S.H., Choi, J.H., Jin, S.O., Das, A., K., *Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulation by first derivative synchronous fluorimetric method*. *Journal of Fluorescence*, **2006** 16(5): p. 713-721.
 128. Pomilio, A.B., Trajtemberg, S.P., Vitale, A.A., *Micellar electrokinetic capillary chromatography of methylxanthines-containing beverages: discussion of the molecular species involved*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2005** 85(4): p. 622-628.
 129. Pomilio, A.B., Trajtemberg, S.P., Vitale, A.A., *High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography*. *Phytochemical Analysis*, **2002** 13(4): p. 235-241.
 130. Aucamp, J.P., Hara, Y., Apostolides, Z., *Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **2000** 876(1-2): p. 235-242.
 131. Stach, D., Schmitz, O.J., *Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography*. *Journal of Chromatography A*, **2001** 924(1-2): p. 519-522.
 132. Watanabe, T., Nishiyama, R., Yamamoto, A., Nagai, Terabe, S., *Simultaneous analysis of individual catechins, caffeine, and ascorbic acid in commercial canned green and black teas by micellar electrokinetic chromatography*. *Analytical Sciences*, **1998** 14(2): p. 435-438.
 133. Zhao, Y.P., Lunte, C.E., *Determination of caffeine and its metabolites by micellar electrokinetic capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography B*, **1997** 688(2): p. 265-274.

134. Hyotylainen, T., Siren, H., Riekkola, M.L., *Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique*. Journal of Chromatography A, **1996** 735(1-2): p. 439-447.
135. Nogueira, T., do Lago, C.L., *Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3,4-dimethoxycinnamate and separation by CZE*. Electrophoresis, **2007** 28(19): p. 3570-3574.
136. Matias, F.A.A., Vila, M., Tubino, M., *Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations*. Journal of the Brazilian Chemical Society, **2004** 15(2): p. 327-330.
137. Bozdogan, A., Acar, A.M., Kunt, G., Caglar, H., *Simultaneous determination of paracetamol, metamizol sodium and caffeine in tablet preparations by partial least-squares spectrophotometric calibration*. Pharmazie, **1994** 49(6): p. 457-458.
138. Altun, M.L., *HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone*. Turkish Journal of Chemistry, **2002** 26(4): p. 521-528.
139. Pucci, V., Mandrioli, R., Raggi, M.A., Fanali, S., *Reversed-phase capillary electrochromatography for the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and caffeine in analgesic tablets*. Electrophoresis, **2004** 25(4-5): p. 615-621.
140. Wei, W., Yu, X.D., Ju, H.X., *Simultaneous determination of several antalgic drugs based on their interactions with beta-cyclodextrin by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatographic Science, **2004** 42(3): p. 155-160.
141. Bouhsain, Z., Garrigues S., delaGuardia, M., *PLS-UV spectrophotometric method for the simultaneous determination of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceutical formulations*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, **1997** 357(7): p. 973-976.
142. Sena, M.M., Poppi, R.J., *N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and*

- caffeine*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2004** 34(1): p. 27-34.
143. Vidal, A.D., Reyes, J.F.G., Barrales, P.O., Diaz, M., *UV spectrophotometric flow-through multiparameter sensor for the simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid, and caffeine*. Analytical Letters, **2002** 35(15): p. 2433-2447.
 144. Satinsky, D., Neto, I., Solich, P., Sklenarova, H., Conceição, M., Montenegro, B.S.M., Araújo, A.N., *Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets*. Journal of Separation Science, **2004** 27(7-8): p. 529-536.
 145. Franeta, J.T., Agbaba, D., Eric, S., Pavkov, S., Aleksic, M., Vladimirov, S., *HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets*. Farmaco, **2002** 57(9): p. 709-713.
 146. Baum, R.G., Cantwell, F.F., *Determination of salicylic-acid and aspirin in multicomponent tablets by liquid-chromatography on a non-ionic resin*. Journal of Pharmaceutical Sciences, **1978** 67(8): p. 1066-1069.
 147. Dalmaso, P.R., Pedano, M.L., Rivas, G.A., *Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine*. Sensors and Actuators B-Chemical, **2012** 173: p. 732-736.
 148. Boros, B., Farkas, A., Jakabová, S., BacsKay, I., Kilár, F., Felinger, A., *LC-MS Quantitative Determination of Atropine and Scopolamine in the Floral Nectar of Datura Species*. Chromatographia, **2010** 71: p. S43-S49.
 149. Weinstein, H., Srebrenik, S., Maayani, S., Sokolovsky, M., *Theoretical-model study of comparative effectiveness of atropine and scopolamine action in central nervous-system*. Journal of Theoretical Biology, **1977** 64(2): p. 295-309.
 150. Melo, C.A.D., Silva, P., Gomes, A.A., Fernandes, D.D.S., Vêras, G., Medeiros, A.C.D., *Classification of Tablets containing Dipyrone, Caffeine and Orphenadrine by Near Infrared Spectroscopy and Chemometric Tools*. Journal of the Brazilian Chemical Society, **2013** 24(6): p. 991-997.

151. Fitzsimons, C.P., Monczor, F., Fernández, N., Shayo, C., Davio, C., *Mepyramine, a histamine H-1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein*. Journal of Biological Chemistry, **2004** 279(33): p. 34431-34439.
152. Zheng, X., Zhou, X., Ji, X., Lin, R., Lin, W., *Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly(4-aminobutyric acid) modified glassy carbon electrode*. Sensors and Actuators B: Chemical, **2013** 178(0): p. 359-365.
153. Matos, R.C., Angnes, L., Araújo, M.C.U., Saldanha, T.C.B., *Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone*. Analyst, **2000** 125(11): p. 2011-2015.
154. Aburjai, T., Amro, B.I., Aideh, K., Abuirjeie, M., Al-Khalil, S., *Second derivative ultraviolet spectrophotometry and HPTLC for the simultaneous determination of vitamin C and dipyrone*. Pharmazie, **2000** 55(10): p. 751-754.
155. Carvalho, D.d.S., Barea, L.M., Kowacs, P.A., Fragoso, Y.D., *Efficacy and tolerability of combined dipyrone, isometheptene and caffeine in the treatment of mild-to-moderate primary headache episodes*. Expert Review of Neurotherapeutics, **2012** 12(2): p. 159-167.
156. Di Nezio, M.S., Pistonesi, M.F., Centurión, M.E., Palomeque, M.E., Lista, A.G., Band, B.S.F., *A home-made hybrid system for the simultaneous determination of ergotamine, dipyrone and caffeine in pharmaceutical preparations*. Journal of the Brazilian Chemical Society, **2007** 18(7): p. 1439-1442.
157. Lau, O.W., Luk, S.F., Cheung, Y.M., *Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulations by differential-pulse voltammetry using a glassy-carbon electrode*. Analyst, **1989** 114(9): p. 1047-1051.
158. Lourencao, B.C., Medeiros, R.A., Rocha-Filho, R.C., Fatibello-Filho, O., *Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid*

and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, **2010** 22(15): p. 1717-1723.

159. Defabrizio, F., *Simultaneous GLC analysis of salicylamide, phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, chlorpheniramine maleate, phenylephrine hydrochloride, and pyrilamine maleate in capsule preparations*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1980** 69(7): p. 854-855.
160. Mendonca Francisco, K.J., C.L. do Lago, *A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector*. *Electrophoresis*, **2009** 30(19): p. 3458-3464.
161. Jaros, 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.
162. Fabre, H., Eddine, N.H., Bressolle, F., Mnadrou, B., *Stability indicating assay for dipyrone .1. separation and quantitative-determination of dipyrone and its degradation products by thin-layer chromatography*. *Analyst*, **1982** 107(1270): p. 61-66.

7 – Trabalhos desenvolvidos

Marra, M. C., Silva, P. L., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., *Ultra-fast determination of scopolamine, orphenadrine, mepyramine, caffeine, dipyrone, and ascorbic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity*. Journal of the Brazilian Chemical Society. Aceito para publicação.

Marra, M. C., Cunha, R. R., Vidal, D. T. R., Munoz, R. A. A., do Lago, C. L., Richter, E. M., *Ultra-fast determination of caffeine, dipyrone, and acetylsalicylic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection and identification of degradation products*. Journal of Chromatography A, **2014** 1327: p. 149-154.

Montes, R. H. O., Marra, M. C., Rodrigues, M. M., Munhoz, R. A. A., Richter, E. M., *Fast determination of ciprofloxacin by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Electroanalysis. Aceito para publicação.

Pereira, P. F., Marra, M. C., Cunha, R. R., Silva, W. P., Munhoz, R. A. A., Richter, E. M., *Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **2014** 713: p. 32-38.

Pereira, P. F., Marra, M. C., Lima, A. B., Santos, W. T. P., Munhoz, R. A. A., Richter, E. M., *Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode*. Diamond and Related Materials, **2013** 39: p. 41-46.

Pereira, P. F., Marra, M. C., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., *Fast batch injection analysis system for in situ determination of ethanol in gasohol and ethanol fuel*. Talanta, **2012** 90: p. 99-102.

Silva, W. C., Pereira, P. F., Marra, M. C., Gimenes, D. T., Cunha, R. R., da Silva, R. A. B., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., *A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection*. Electroanalysis, **2011** 23: p. 2764-2770.

Artigo em redação

Gimenes, D. T., Marra, M. C., Angnes, L., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., *Fast simultaneous determination of hydrochlorothiazide and captopril by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*.

Gimenes, D. T., Marra, M. C., Angnes, L., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., *Ultra-fast simultaneous determination of propranolol and hydrochlorothiazide: comparison of batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*.