



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química - Mestrado

**Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por
eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).**

MICHELLE MIRANDA ARAÚJO DE CARVALHO RIBEIRO

Dissertação de Mestrado

UBERLÂNDIA

Junho

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química

**Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por
eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).**

Dissertação de Mestrado 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.

Aluna: Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Química Analítica

Junho

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- R484d
2017 Ribeiro, Michelle Miranda Araújo de Carvalho, 1991
Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D). / Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro. - 2017.
119 p. : il.
- Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.
1. Química - Teses. 2. Diclofenaco - Teses. 3. Eletroforese capilar - Teses. 4. Codeína - Teses. I. Richter, Eduardo Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Titulo.



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 257/PPQUI.

DATA: 20/06/2017

DISCENTE: Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro

MATRÍCULA: 11512QMI011

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D).


ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada


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

Às quatorze horas do dia vinte de junho do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Thiago Nogueira, da Universidade Estadual Paulista, Alam Gustavo Trovó e Eduardo Mathias Richter, da Universidade Federal de Uberlândia, 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 seqüência, 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 mantido o mesmo

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Thiago Nogueira
UNESP


Prof. Dr. Alam Gustavo Trovó
UFU


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

*“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água no
mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcuta

*Á minha mãe Nilce, minha avó Maria e a minha tia Candita, pelo incentivo nos estudos e
dedicação em minha criação e apoio.*

Ao meu marido e companheiro, pelo carinho, amor e compreensão.

*Ao bem mais precioso, meu filho Theo, que chegou durante esta jornada pra me dar mais
forças e motivação.*

*Ao meu orientador, Eduardo, pelo conhecimento compartilhado, paciência e
compreensão.*

*Á todos os amigos que conquistei nesta jornada de laboratório, pela ajuda, apoio e
diversão.*

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre presente, me fornecendo força e paciência para sempre seguir em frente e iluminando o caminho que percorro em minha vida.
- A toda minha Família, mãe, tios e tias, avós, irmãos e primos.
- Às duas pessoas mais importantes de minha vida, meu marido e meu filho, por me completar e me dar forças para sempre seguir em frente em busca do melhor para nós três.
- Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, pelas horas dedicadas a me ensinar, pela paciência e incentivo, pela confiança em mim depositada, pela compreensão, principalmente com minha gestação durante o mestrado e pela amizade oferecida dentro e fora do laboratório.
- Ao prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, também pelos ensinamentos e todas as contribuições para meu crescimento, além do apoio e amizade.
- A todos os amigos dos laboratórios de pesquisa do IQ-UFU, pela amizade, respeito e por todos os momentos de descontração, que fizeram as duras e longas horas de trabalho mais macias e divertidas, pela ajuda nas discussões e pela troca de experiências. Especialmente aos membros do Nupe: Gracy, Mariana, Daly, Jéssica, Ana Paula, Thiago Tormin, Thiago Costa, Jhonys, Poli Freire, Brenda, Weberson, Raquel e Rafael que se tornaram grandes amigos, e que compartilharam momentos inesquecíveis tanto no laboratório quanto fora dele.
- Aos amigos da graduação (marmotas) que se mantiveram sempre comigo.
- Aos professores do IQ-UFU que contribuíram para a minha formação.
- Aos membros da banca pela aceitação e contribuições a serem concedidas para o aprimoramento deste trabalho.

- Às agências de fomento, FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelas bolsas de Iniciação Científica, que foi o primeiro passo para o mestrado, e de Mestrado, também pelos auxílios financeiros nos projetos e nos congressos em que participei.
- Ao Instituto de Química pelo espaço concedido e aos seus funcionários pela paciência, colaboração e amizade.

RESUMO

Neste trabalho são apresentados três novos procedimentos analíticos para determinação rápida e simultânea de: (i) difenidramina (DIF), piridoxina (PIR) e 8-cloroteofilina (CTF) ($t < 3$ min); (ii) nafazolina (NAF) e zinco (Zn) ($t < 41$ s); (iii) NAF associada com DIF ou feniramina (FEN) ou clorfeniramina (CFEN) ($t < 35$ s) via eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D). Os métodos propostos podem ser usados no controle de qualidade de matérias primas e de formulações farmacêuticas que possuam tais compostos em sua composição. Portanto, três métodos distintos foram desenvolvidos: Para a determinação simultânea do grupo (i) foi utilizado um eletrólito de corrida (BGE) composto por 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico e 25 mmol L⁻¹ de NaOH (pH= 9,0). Os limites de detecção (LOD) foram de 0,6; 1,3 e 1,3 µmol L⁻¹ para DIF, PIR e CTF, respectivamente. O método se mostrou exato, com valores de recuperação entre 98 e 100%. Para a determinação simultânea do grupo (ii) foi utilizado um BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de MES e 20 mmol L⁻¹ HIS (pH= 6,0). Os LODs foram de 20 e 30 µmol L⁻¹ para NAF e Zn, respectivamente. O método apresentou valores de recuperação entre 97 e 102%. Para a determinação simultânea do grupo (iii) foi utilizado um BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ de ácido 3,4 dimetoxicinâmico (DMX) + 1 mmol L⁻¹ de NaOH (pH= 9,8). Os LODs foram de 25 µmol L⁻¹ para NAF, DIF e FEN e de 13 µmol L⁻¹ para CFEN. O método apresentou valores de recuperação entre 94 e 101%. As curvas de calibração para todas as espécies quantificadas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,996 e DPR menores que 3,5% (n=10). Os resultados obtidos com os métodos propostos foram estatisticamente similares (nível de confiança de 95%) aos obtidos por HPLC e FAAS. Além disso, os métodos CE-C⁴D desenvolvidos são simples, geram quantidades mínimas de resíduos (menor impacto ambiental), são de baixo custo (equipamento e manutenção) e possuem elevadas frequências analíticas: ~21 injeções h⁻¹ para formulação (i), ~90 injeções h⁻¹ para formulação (ii) e ~115 injeções h⁻¹ para as formulações (iii).

Palavras chave: Determinação simultânea, Controle de qualidade, Amostras farmacêuticas, Princípios ativos, Metais, CE-C⁴D.

ABSTRACT

This work presents three new analytical procedures for rapid and simultaneous determination of: (i) diphenhydramine (DIF), pyridoxine (PIR) and 8-chlorotheophylline (CTF) ($t < 3$ min); (ii) naphazoline (NAF), and zinc (Zn) ($t < 41$ s); (iii) NAF associated with DIF or pheniramine (FEN) or chlorpheniramine (CFEN) ($t < 35$ s) by capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection (CE-C⁴D). The proposed methods can be used in quality control of raw materials and pharmaceutical formulations having such compounds in its composition. Therefore, three different methods were developed: for simultaneous determination of group (i), the BGE was composed by 20 mmol L⁻¹ of boric acid and 25 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 9.0). The limits of detection (LOD) was 0.6, 1.3 and 1.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for DIF, PIR and CTF, respectively. The method was accurate with recovery values between 98 and 100%. For simultaneous determination of group (ii), the BGE was composed by HIS/MES (20 mmol L⁻¹ each) (pH = 6.0). The LODs were 20 and 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for NAF and Zn, respectively. The method presented recovery values between 97 and 102%. For simultaneous determination of group (iii), the BGE was composed by HIS 20 mmol L⁻¹ + DMX 10 mmol L⁻¹ + 1 mmol L⁻¹ de NaOH (pH = 9.8). The LODs were 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for NAF, DIF and FEN and 13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for CFEN. The recovery values were between 94 and 101%. Calibration curves for all species showed correlation coefficients greater than 0.996 and RSD values less than 3.5% ($n = 10$). The results obtained with the proposed methods were statistically similar (confidence level of 95%) to those obtained by HPLC (organic compounds) and FAAS (Zn). Furthermore, the CE-C⁴D methods are simple, generates a minimum amount of waste (lower environmental impact), are low cost (equipment and maintenance) and has a high analytical frequency: ~ 21 injections h⁻¹ (i) ~ 90 injections h⁻¹ (ii) and ~ 115 injections h⁻¹ (iii).

Keywords: Simultaneous determination, Quality control, pharmaceutical samples, Active ingredients, Metals, CE-C⁴D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais. Adaptado de HEIGER (1997).

Figura 2 – Representação da interface capilar/solução. Fonte: (TAVARES, 1996).

Figura 3 – Representação esquemática da adsorção de surfactantes catiônicos sobre a superfície interna de capilares de sílica fundida. Adaptado de (TAVARES; COLOMABRA; MASSARO, 1997).

Figura 4 - Perfis dos fluxos eletrosmótico (a) e laminar (b), e suas correspondentes zonas de amostras. FONTE: (HEIGER, 1997).

Figura 5 - Esquema do sistema de detecção C^4D e representação de um eletroferograma com pico positivo e pico negativo. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.

Figura 6 – Fórmula estrutural da (a) DIF e (b) CTF. Fonte: chemicalize.org

Figura 7 – Fórmula estrutural da PIR. Fonte: chemicalize.org

Figura 8 – Fórmula estrutural da NAF. Fonte: chemicalize.org

Figura 9 – Fórmula estrutural da (a) FEN e (b) CFEN. Fonte: chemicalize.org

Figura 10 – (a) Imagem do equipamento usado no laboratório; (b) Esquema do sistema e modo de injeção usado nesse trabalho.

Figura 11 – Estruturas e valores de pK_a da difenidramina (DIF), piridoxina (PIR) e 8-cloroteofilina (CTF) e as curvas da relação de carga versus pH (●; DIF), (■; PIR) e (▲; CTF) (SWAIN, 2012).

Figura 12 - Efeito da variação de pH na separação de DIF, CTF e PIR por CZE. Concentrações dos analitos: 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10 mmol L^{-1} de TEA com pH ajustado com OXA; Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 13 - Efeito da variação da composição do BGE na separação de DIF, CTF e PIR por CZE. Concentrações dos analitos: 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10 mmol L^{-1} de TEA com pH ajustado em 9,5 com: (a) β -alanina; (b) OXA; (c) CHES; (d) HAC; (e) HCl; (f) DMX e (g) HFos. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 14 – Eletroferogramas de uma solução padrão e amostra de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10 mmol L^{-1} de TEA com pH = 9,5 ajustado com HAC; Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 15 – Estudo do efeito do pH na análise dos padrões e amostras de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico com pH ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 16 – Eletroferogramas de uma solução padrão e amostra de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE's: (A) 10 mmol L^{-1} de ácido bórico com pH = 9,0 ajustado com NaOH e (B) 20 mmol L^{-1} de ácido bórico com pH = 9,0 ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 17 – Estudo do tempo de injeção utilizando uma solução padrão de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 20 mmol L^{-1} de ácido bórico + 25 mmol L^{-1} de NaOH, pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,25 – 1,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 18 – Estudo da repetibilidade com dez injeções sucessivas utilizando uma solução padrão de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 20 mmol L^{-1} de ácido bórico + 25 mmol L^{-1} de NaOH, pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 19 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão de DIF, CTF e PIR e suas respectivas curvas analíticas. Concentrações crescentes dos analitos: (a – i: 100 – 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de DIF e CTF e (a – i: 50 – 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de PIR. BGE: 20 mmol L^{-1} de ácido bórico + 25 mmol L^{-1} de NaOH, pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,25 – 1,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 20 - Curva da relação de carga versus pH da molécula de NAF. (SWAIN, 2012).

Figura 21 – Estudo da composição do BGE utilizando uma solução padrão de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e 930 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE's: 10, 20 e 30 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um pH = 6,1. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 13 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 22 – Estudo do tempo de injeção de uma solução padrão de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e 930 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um pH = 6,1. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,75 – 2,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10±2 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 23 – Estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de uma solução padrão de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $930 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente; EOF: normal.

Figura 24 – Eletroferogramas obtidos a partir de soluções padrão de NAF e Zn e suas respectivas curvas de calibração. Concentrações crescentes dos analitos: NAF ($100 - 500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Zn ($300 - 1500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente; EOF: normal.

Figura 25 – Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão (a) e amostra (b) de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $900 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente; EOF: normal.

Figura 26 - Curva da relação de carga versus pH da molécula de (A) FEN, (B) CFEN e (C) DIF. (SWAIN, 2012).

Figura 27 – Eletroferogramas obtidos com a injeção de duas soluções padrão contendo NAF e DIF (Grupo 1) e NAF, FEN e CFEN (Grupo 2). Concentração de todos os analitos: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. BGE: 10 mmol L^{-1} de TEA + OXA até $\text{pH}=8,5$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40 cm , respectivamente; EOF: normal.

Figura 28 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de duas soluções amostra contendo NAF + DIF (solução nasal) ou NAF + FEN (solução oftalmológica) diluídas em água (duas vezes). BGE: 20 mmol L^{-1} de MES e HIS ($\text{pH}=6,1$). Injeção hidrodinâmica: 25

kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 29 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão e amostra contendo NAF + DIF. BGE's (pH ajustado com NaOH): (A) 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico (pH = 9,5); (B) 20 mmol L⁻¹ de MÊS (pH = 6,1); (C) 20 mmol L⁻¹ de CHES (pH = 8,5); (D) 50 mmol L⁻¹ de CHES (pH = 8,5); (E) 12 mmol L⁻¹ TEA + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 8,5); (F) 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 9,8). Concentração: 250 µmol L⁻¹ de DIF e 500 µmol L⁻¹ de NAF. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 30 – Eletroferogramas obtidos pela injeção de soluções padrão contendo de NAF e DIF. Concentração dos analitos: 250 µmol L⁻¹ de DIF e 500 µmol L⁻¹ de NAF. BGE's: (1) 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ DMX + NaOH (pH = 9,5) e (2) 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ HCl + NaOH (pH = 9,5). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 31 – Estudo do tempo de injeção utilizando soluções padrões contendo: (A) NAF + DIF (500 + 250 µmol L⁻¹); (B) NAF + FEN (100 + 840 µmol L⁻¹); (C) NAF + CFEN (500 + 312,5 µmol L⁻¹). BGE: 20 mmol L⁻¹ de HIS com 10 mmol L⁻¹ DMX e 1 mmol L⁻¹ de NaOH (pH = 9,8); Pressão de injeção: 25 kPa; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 32 – Estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por NAF +DIF (500 e 250 µmol L⁻¹), NAF + FEN (100 e 840 µmol L⁻¹) e NAF + CFEN (500 e 312,5 µmol L⁻¹). BGE: 20 mmol L⁻¹ de HIS com 10 mmol L⁻¹ DMX + 1 mmol L⁻¹ de NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,25 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 33 – Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de NAF + DIF, NAF + FEN e NAF + CFEN e suas respectivas curvas de calibração. Concentrações: (A) DIF ($50 - 800 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($100 - 1600 \mu\text{mol L}^{-1}$), de (B) FEN ($420 - 1750 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($50 - 210 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (C) CFEN ($50 - 322 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($80 - 500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS com 10 mmol L^{-1} DMX e 1 mmol L^{-1} de NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,25 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 34 – Eletroferogramas obtidos com soluções padrões (a) e amostras (b) contendo NAF + DIF (A), NAF + FEN (B) e NAF + CFEN (C). Concentração dos analitos: (A) $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF; (B) $313 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CFEN e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e (C) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $840 \mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN. BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS com 10 mmol L^{-1} DMX e 1 mmol L^{-1} de NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,25 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Figura 35 – Eletroferogramas de uma solução padrão sem (a) e com (b) com adição de 10 mmol L^{-1} de NaCl e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cloreto de benzalcônio e de uma solução amostra (c). Concentração dos analitos: $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF. BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS com 10 mmol L^{-1} DMX e 1 mmol L^{-1} de NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,25 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.

Quadro 2 - Relação de reagentes e empresas onde foram adquiridos.

Tabela 1 – Características analíticas estudadas para três diferentes composições de BGE's na determinação simultânea de DIF, PIR e CTF.

Tabela 2 – Características analíticas do método proposto.

Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de DIF, PIR e CTF via CE-C⁴D versus os obtidos por HPLC.

Tabela 4 – Características analíticas do método proposto.

Tabela 5 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de NAF e Zn via CE-C⁴D e por HPLC e FAAS.

Tabela 6 – Relação dos parâmetros otimizados.

Tabela 7 – Características analíticas do método proposto.

Tabela 8 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de NAF + DIF, NAF + FEN e NAF + CFEN via CE-C⁴D versus os obtidos por HPLC.

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

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

CEC - Eletrocromatografia capilar (do inglês “*capillary electrochromatography*”)

CFEN – Clorfeniramina

CGE - Eletroforese capilar em gel (do inglês “*capillary gel electrophoresis*”)

CIEF - Focalização isoeétrica (do inglês “*capillary isoelectric focusing*”)

CITP - Isotacoforese (do inglês “*capillary isotachophoresis*”)

CTF – 8-cloroteofilina

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

DIF – Difenidramina

DMX – ácido 3,4 - dimetoxicinâmico

DPR – Desvio padrão relativo

RSD - Relative standard deviation

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

FEN – Feniramina

GC – Cromatografia gasosa (do inglês “*Gas chromatography*”)

HIS - Histidina

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

LC – Cromatografia Líquida (do inglês “*Liquid cromatography*”)

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

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

MEKC - Cromatografia eletrocinética micelar (do inglês “*micellar electrokinetic chromatography*”)

MES – Ácido 2-(N-morfolino) ethanosulfônico

NAF – Nafazolina

PIR – Piridoxina

SDS - dodecilsulfato de sódio

TEA – Trietanolamina

Zn – Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Breve histórico	21
1.2	Vantagens e limitações	23
1.3	Abordagem teórica	24
1.3.1	<i>Teoria</i>	25
1.3.2	<i>O conceito de mobilidade efetiva</i>	25
1.3.3	<i>Teoria da migração eletrosmótica</i>	26
1.3.4	<i>Fluxo eletrosmótico (EOF)</i>	26
1.4	Modalidades eletroforéticas de análise	32
1.5	Determinação simultânea de cátions e ânions	33
1.6	Sistemas de detecção em CE	35
1.7	Detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C ⁴ D)	38
1.8	Análises rápidas por CE	42
1.9	Espécies estudadas	44
1.9.1	<i>Difenidramina (DIF) e 8-cloroteofilina (CTF)</i>	44
1.9.2	<i>Piridoxina (PIR)</i>	45
1.9.3	<i>Nafazolina (NAF)</i>	46
1.9.4	<i>Feniramina (FEN) e Clorfeniramina (CFEN)</i>	47
1.9.5	<i>Zinco</i>	48
1.10	<i>Formulações farmacêuticas estudadas</i>	49
2	OBJETIVOS	52
2.1	Objetivo Geral	52
2.2	Objetivos Específicos	52
3	PARTE EXPERIMENTAL	53
3.1	Reagentes e amostras	53

3.2	Instrumentação.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1	Determinação simultânea de DIF, PIR e CTF.....	58
4.1.1	<i>Conclusões parciais</i>	73
4.2	Determinação simultânea de NAF e Zn.	74
4.2.1	<i>Conclusões parciais</i>	82
4.3	Determinação simultânea de NAF + DIF; NAF + FEN; NAF + CFEN.	84
4.3.1	<i>Conclusões parciais</i>	100
5	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS	101
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
7	TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO PERÍODO	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico

Na ciência das separações, grandes avanços tecnológicos têm sido observados ao longo de décadas, principalmente na área de aplicações e instrumentação. Na década de 50 foi introduzido a cromatográfica gasosa (GC), a década de 70 presenciou o desenvolvimento da cromatografia líquida (LC) e a década de 80 contou com a implementação de mais uma técnica de separação, a eletroforese capilar (CE, do inglês “*capillary electrophoresis*”) (TAVARES, 1997).

A eletroforese começou a ser desenvolvida na década de 30 pelo químico e bioquímico sueco Arne Tiselius, o qual desenvolveu em sua tese de doutorado o estudo da separação de proteínas no soro sanguíneo utilizando a técnica baseada na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em um eletrólito, através do qual tinha sido aplicado um campo elétrico (TISELIUS, 1930). Esse tipo de separação em solução livre possui limitações em sua eficiência devido ao aquecimento desta solução causado pelo efeito Joule, caracterizado pela produção de calor quando uma corrente elétrica atravessa um material condutor. Essas separações são muito semelhantes às utilizadas hoje em dia para a análise de macromoléculas e são chamadas de eletroforese em placas de gel, que são de baixa eficiência e longos tempos de análise.

Logo no início dos anos 60, Hjérten (1967) descreveu a eletroforese em tubos capilares, com o emprego de um tubo de quartzo de 0,3 mm e voltagens que variavam entre 2,5 – 3,0 kV. Neste trabalho foi proposto um sistema giratório para minimizar os efeitos de convecção que afetavam os sistemas estacionários e, desta forma, a eficiência da técnica foi melhorada. Hjérten, em 1983, também contribuiu muito para a área com um

trabalho onde adaptou a eletroforese em gel para os tubos capilares, porém, os problemas de eficiência foram mantidos (HJERTEN, 1983).

Na década de 80, a história da eletroforese teve um grande avanço com os trabalhos de Jorgenson e Lukacs (JORGENSEN; LUKACS, 1981; JORGENSEN; LUKACS, 1983). Eles utilizaram pela primeira vez, capilares de sílica fundida com diâmetro interno extremamente pequenos ($\sim 75 \mu\text{m}$) e contribuíram significativamente no aprimoramento tanto na instrumentação existente quanto na teoria da técnica. Com essa redução do diâmetro interno do capilar, o efeito Joule que tanto prejudicava o desempenho da técnica praticamente deixou de existir. O uso de capilares com diâmetro interno da ordem de micrometros fez com que aumentasse a relação entre a área superficial interna do capilar e o volume da solução, isto favorece a dissipação de calor e permite a aplicação de campos elétricos mais elevados. Desta forma foi possível diminuir drasticamente os tempos de análise promovendo uma maior eficiência da separação.

Assim, desde que foi criada, a eletroforese possui o mesmo princípio básico de funcionamento, que é definido como o transporte (migração), em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre suas mobilidades efetivas. A eletroforese capilar tem abrangido praticamente todas as áreas relacionadas às ciências naturais, pois vem sendo aplicada na separação desde íons inorgânicos, como o cloreto e o sódio, até macromoléculas (CUNHA, 2013). Desta forma, a CE despertou interesse de vários grupos de pesquisa no mundo todo, elevando muito a sua aplicabilidade.

1.2 Vantagens e limitações

A CE é uma técnica que possui muitos atrativos, dentre eles está o fato da instrumentação ser relativamente simples quando comparada a muitas outras técnicas de separação. Esta característica permitiu que muitos grupos de pesquisa produzissem seus próprios equipamentos, como é o caso do equipamento usado na realização do presente trabalho (DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009; de CARVALHO et al, 2009). Além disto, existem vários outros fatores que são vistos pela comunidade científica como atrativos para a técnica, como (CUNHA, 2013):

- Custo reduzido: tanto com relação ao equipamento quanto a manutenção. Isso é devido à utilização de pequenos volumes de reagentes (solventes) e amostras, já que são injetados no equipamento volumes de padrões e amostras na ordem de nanolitros, principalmente se comparado com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que é uma técnica de separação amplamente utilizada;
- Versatilidade: para fazer análises utilizando compostos de classes distintas, basta substituir o BGE, ou seja, uma variedade de modos de separação podem ser efetuados em uma única coluna capilar com uma diversidade de compostos passíveis de análise em cada modo. Isto facilita a manipulação do equipamento, já que não há necessidade de trocar o capilar à cada tipo diferente de análise, que apesar de ser uma tarefa relativamente simples, gasta-se tempo e compromete a frequência analítica do método. A economia também pode ser considerada neste caso, já que a aquisição de diferentes colunas não é necessária;
- Elevada frequência analítica: Em geral os tempos de análise são menores quando comparado com as outras técnicas de separação;

- Análise simultânea: capacidade de analisar simultaneamente compostos com características químicas completamente distintas (íons metálicos e compostos orgânicos), além da capacidade de analisar simultaneamente e com apenas uma diluição, amostras com proporções de analitos muito discrepantes.

Porém, uma técnica que apresente apenas vantagens como características ainda não é do nosso conhecimento, e com a CE não seria diferente. Portanto, a técnica também apresenta algumas limitações, como (CUNHA, 2013):

- Limites de detecção (LOD) relativamente elevados: a CE- C^4D possui LOD's da ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol L⁻¹, desta forma a técnica apresenta limitações na análise de amostras biológicas (ex: urina, sangue), já que estas na maioria das vezes apresentam concentrações dos analitos na ordem de traços.

- Dependência dos valores de pH do BGE: esta característica gera a necessidade de se possuir um tampão estável.

1.3 Abordagem teórica

Neste tópico serão discutidos fundamentos teóricos que são aplicáveis à eletroforese capilar de zona, praticada em capilares de sílica fundida, que é utilizado no presente trabalho. Nos outros tipos de eletroforese, as equações passam por algumas modificações, porém, o fundamento básico é similar.

1.3.1 Teoria

Todos os detalhes com relação aos aspectos teóricos, como o desenvolvimento de cálculos e revisões são de fácil acesso e estão disponíveis na literatura: (TAVARES, 1996; TAVARES, 1997; HEIGER, 1997). Trabalhos mais recentes trazem animações para explicar os fundamentos da eletroforese capilar (VAZ; de OLIVEIRA; de OLIVEIRA, 2015).

1.3.2 O conceito de mobilidade efetiva

O conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, onde qualquer substância (i) presente em solução de formas diferentes (j) estão relacionadas entre si por um equilíbrio ácido base rápido, e irá migrar em um campo elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva, onde α é a fração molar (TAVARES, 1996):

$$\text{Equação 1: } \mu_{ef} = \sum \mu_j \alpha_j$$

Com a aplicação de um potencial E teremos a velocidade eletroforética efetiva v_{ef} :

$$\text{Equação 2: } v_{ef} = \mu_{ef} \times E$$

As funções de distribuição dependem da magnitude das constantes de dissociação do soluto (pKa), desta forma, a equação 10 sugere uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio. Os conceitos de μ_{ef} e v_{ef} são de fundamental importância, porque frequentemente a separação entre duas espécies com mobilidades eletroforéticas semelhantes é possível através da modificação dos valores de α pela escolha adequada do pH do BGE ou pela adição de determinado complexante ao mesmo. Assim,

espécies podem ser separadas pela manipulação de sua distribuição via pKa ou via constantes de estabilidade do complexo formado.

1.3.3 Teoria da migração eletrosmótica

Quando se trata da mobilidade eletrosmótica, temos uma equação que é governada por ϵ_r que é a permitividade da solução, ϵ_o que é a permitividade do vácuo, ζ que é o potencial zeta, o qual é desenvolvido no plano de cisalhamento, e η que é a viscosidade dinâmica da solução. Com a aplicação de um potencial E teremos a velocidade eletrosmótica v_{eo} :

$$\text{Equação 3: } \mu_{eo} = \frac{\epsilon_r \times \epsilon_o \times \zeta}{\eta}$$

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

Esta equação é válida quando o raio do capilar é grande se comparada à espessura da dupla camada elétrica.

1.3.4 Fluxo eletrosmótico (EOF)

A sílica fundida (SiO_2) é o material mais utilizado na fabricação dos capilares para CE. Este material possui propriedades interessantes como maleabilidade, baixa condutividade elétrica e resistência ao ataque químico, entre outras. Dentre as várias características, uma bastante peculiar é a sua capacidade de formação do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*) (TAVARES, 1996).

A formação da dupla camada elétrica se dá pela presença de vários grupos silanóis (SiOH) residuais na superfície interna do capilar. Esses grupos apresentam um caráter

ácido, o qual é considerado relativamente fraco ($pK_a \sim 6$). Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados e, com a ionização, a superfície do capilar se torna negativamente carregada, e, dependendo do pH do eletrólito de corrida, estes grupos poderão estar totalmente protonados ou parcialmente protonados ou ainda totalmente desprotonados. A Figura 1 mostra o efeito do pH sobre a mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.

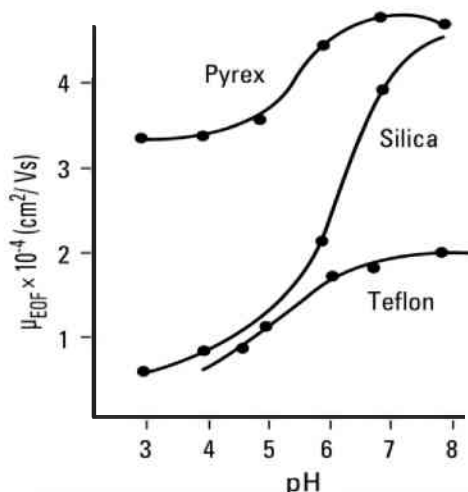


Figura 1 – Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais. Adaptado de HEIGER (1997).

É possível observar na Figura 1 que a desprotonação dos grupos silanóis se inicia em pH 3 e, em pH 8, a ionização é praticamente completa. A Figura 2 mostra um modelo para o que ocorre na interface do capilar/solução, o qual descreve a região imediatamente adjacente à superfície ocupada por camadas de moléculas de água orientadas e também alguns íons, os quais devido às forças eletrostáticas (adsorção específica) são atraídos fortemente pela superfície de forma a manter a eletroneutralidade do sistema. O plano definido por esses íons é conhecido por plano interno de Helmholtz (IHP).

Os íons hidratados que se aproximam da superfície são mais fracamente ligados à esta superfície, e a interação é dependente das propriedades químicas dos íons (adsorção não específica). O plano definido pelo centro dos íons hidratados é conhecido como plano

externo de Helmholtz (OHP), e é ela que delimita a camada compacta da dupla camada elétrica. A concentração de íons de carga oposta à superfície decresce com a distância e, eventualmente, aproxima-se do valor de concentração dos íons na solução, e essa região é conhecida como a camada difusa da dupla camada elétrica.

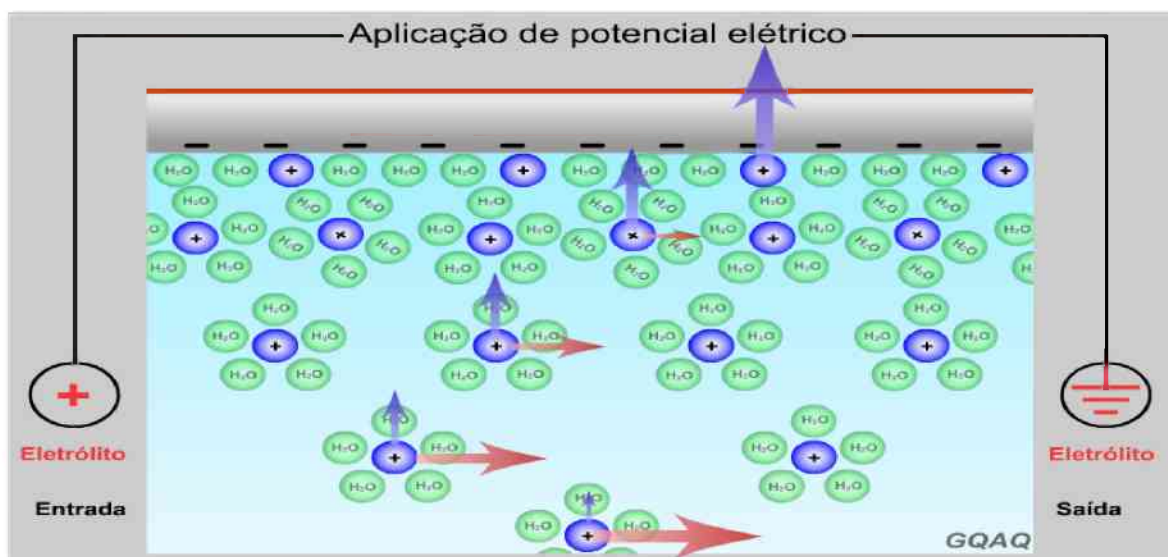


Figura 2 – Representação da interface capilar/solução. Fonte: (VAZ; de OLIVEIRA; de OLIVEIRA, 2015).

Quando um campo elétrico longitudinal é aplicado (aliado ao diâmetro interno do capilar – menor que 100 μm) inicia-se um processo de migração dos íons do BGE envolvidos na formação da dupla camada elétrica para os pólos de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, este é o EOF. As cargas mais próximas da parede do capilar não migram, porém, as cargas positivas da camada difusa, que é caracterizado como o plano de cisalhamento, são arrastadas em direção ao cátodo (polo negativo) e esse fluxo é chamado de EOF normal.

Deste modo ocorre uma migração líquida maior de cátions ($\mu_{\text{ef}} + \mu_{\text{eof}}$) em direção ao cátodo comparada a migração líquida de ânions ($\mu_{\text{ef}} - \mu_{\text{eof}}$) em direção ao ânodo. Uma analogia pertinente seria considerar o EOF como sendo a correnteza de um rio no qual os cátions nadam a favor da correnteza e os ânions contra esta.

Quando se faz a análise de ânions é comum inverter a direção do EOF, tanto para obter melhor resolução quanto para aumentar a velocidade da análise. Fuerstenau (FUERSTENAU, 1956) foi o pioneiro com um trabalho que visava a inversão do EOF utilizando surfactantes catiônicos.

No entanto, este tipo de inversão nem sempre é necessária, como é o caso de ânions com baixa mobilidade eletroforética, ou seja, neste caso eles são “arrastados” pelo EOF na direção do cátodo, já para ânions que possuem elevada mobilidade eletroforética, a inversão do EOF é indispensável para que a análise ocorra em tempos aceitáveis ou que seja possível (ânions podem ter velocidade similar ou até serem mais rápidos que o EOF). Ânions de elevada mobilidade eletroforética podem ser analisados na presença de EOF normal, desde que o EOF seja de velocidade reduzida ($\text{pH do BGE} < 6$ ou concentração elevado do BGE) (KUBA'N, et al. 2014). O método mais utilizado na inversão do EOF emprega a adição de tensoativos catiônicos ao BGE, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês “cetyltrimethylammonium bromide”). Apesar de serem muito utilizados surfactantes catiônicos na prática da análise de ânions por CE, são poucos os trabalhos que se dedicam a explicar o mecanismo pela qual a inversão do fluxo ocorre (KANETA; TANAKA; TAGA, 1993; LUCY, 1996; TAVARES, 1997).

Quando o capilar sem modificação se encontra carregado negativamente ($\text{pH} > 3$), na adição deste inversor (surfactante catiônico), uma camada fortemente ligada e formada por semi-micelas é adsorvida na superfície interna do capilar carregando a parede interna com cargas positivas. Assim, os ânions do tampão passam a fazer parte da dupla camada elétrica, os quais, sob a ação do campo elétrico se movem em direção ao ânodo (polo positivo). A Figura 3 apresenta um esquema do fluxo eletrosmótico invertido.

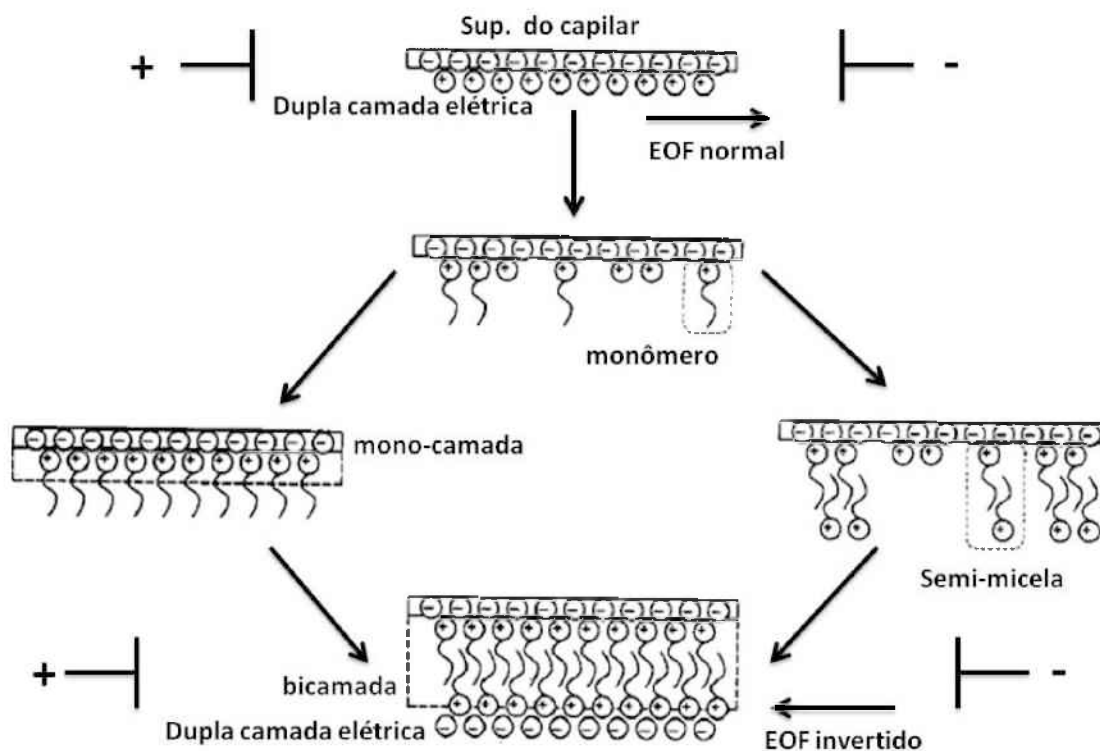


Figura 3 – Representação esquemática da adsorção de surfactantes catiônicos sobre a superfície interna de capilares de sílica fundida. Adaptado de (TAVARES; COLOMABRA; MASSARO, 1997).

Na presença do EOF, a migração das espécies não está relacionada apenas às suas próprias mobilidades, pois a essas será somada ou subtraída a mobilidade do EOF. Deste modo, ao se analisar um eletroferograma, o tempo que as espécies levam para percorrer um determinado comprimento de capilar é determinado pela sua velocidade aparente (v_{ap}), como mostra a Equação 5, a qual corresponde à soma das suas velocidades efetivas (v_{ef}) e da velocidade do EOF (v_{EOF}). Desta forma, o sinal da v_{EOF} depende da direção da mesma, adquirindo um sinal positivo caso tenha a mesma direção da v_{ef} , e negativo, caso seja em direção oposta.

$$\text{Equação 5: } v_{ap} = v_{ef} \pm v_{EOF}$$

A existência do EOF tem importantes implicações na CE, pois o fluxo de solução contribui bastante para a automação da técnica, permitindo a introdução de amostra e detecção diretamente no capilar. Uma característica que contribui para a alta eficiência da técnica está vinculada ao perfil radial da velocidade eletrosmótica. Sendo linear, o mesmo componente de velocidade é adicionado a todos os solutos independente da sua posição radial, ou seja, a análise por CE é livre do efeito de parede presente no fluxo laminar gerado quando se tem fluídos impulsionados sob pressão através de uma tubulação, como no caso de análises em cromatografia líquida em coluna (Figura 4). Essa característica é positiva, pois faz com que os sistemas CE possuam uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo, proporcionando a esta técnica maior eficiência de separação quando comparado a HPLC.

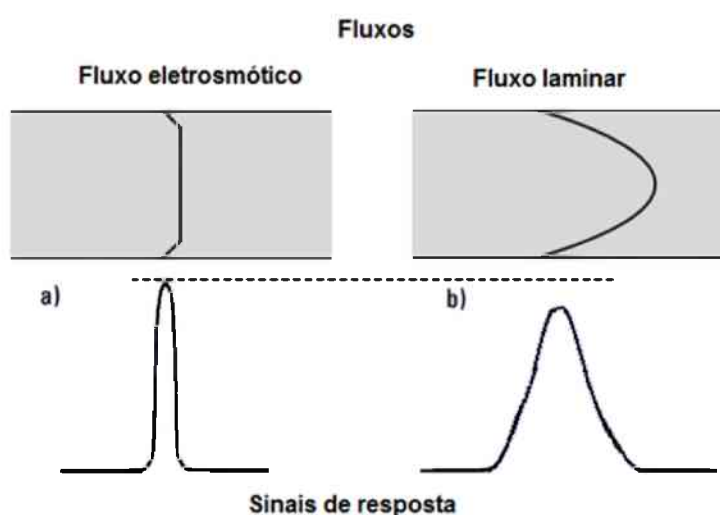


Figura 4 - Perfis dos fluxos eletrosmótico (a) e laminar (b), e suas correspondentes zonas de amostras. FONTE: (HEIGER, 1997).

Existem alguns fatores que podem afetar a velocidade do EOF, como por exemplo: o campo elétrico, que afeta proporcionalmente a velocidade do EOF, eficiência, resolução e temperatura, e afeta inversamente o tempo de análise. Já o pH do BGE influencia diretamente na ionização da parede interna do capilar, e por sua vez, no potencial zeta (ζ),

assim modifica a seletividade do sistema. Por sua vez, a força iônica afeta inversamente o ζ e o EOF, pois promove a compressão da dupla camada elétrica e uma maior influência no efeito Joule devido à presença de correntes mais elevadas para maiores concentrações. Alterações na temperatura e a utilização de modificadores orgânicos modificam a viscosidade do sistema afetando também diretamente o EOF (HEIGER, 1997).

1.4 Modalidades eletroforéticas de análise

Como já mencionado, a eletroforese é uma técnica de separação que se baseia na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, sob aplicação de um campo elétrico. Existem vários modos de separação possíveis com mecanismos singulares e seletividade característica. Dentre estes, estão inclusos a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês “capillary zone electrophoresis”), que é o modo de separação mais utilizado em CE, a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês “micellar electrokinetic chromatography”), eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês “capillary gel electrophoresis”), eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês “capillary electrochromatography”), isotacoforese capilar (CITP, do inglês “capillary isotachopheresis”) e focalização isoeletrica capilar (CIEF, do inglês “capillary isoelectric focusing”).

Entre os modos de separação existentes em CE, a CZE é a mais simplória e a mais amplamente praticada em razão da facilidade de implementação e avaliação das melhores condições experimentais.

A CZE baseia-se somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (cátions ou ânions). Quando o potencial de separação é aplicado, cada zona migra independentemente, com velocidade constante, mas diferenciada, que é característica de sua própria mobilidade. Geralmente, sua implementação é realizada em eletrólitos aquosos

que podem ser misturados a aditivos ou complexantes com intuito de interagir com analitos, alterando suas mobilidades (TAVARES, 1997). As modalidades da eletroforese em solução livre, gel e micelar pertencem a essa categoria.

Os outros tipos de modalidades eletroforéticas estão muito bem descritos e detalhados em diversos artigos da literatura: (SANTANA; TAVARES; RUBIM, 1997; KIRBY; MILLER; RIVIER, 1993; TAVARES, 1993; SCHUSTER; GRATZFELD-HÜSGEN, 1994; TERABE, 1992; TAVARES, 1997; PROTOCOLO, 1993; WALLINGFORD, 1996; SEGATO; SILVA; JARDIM, 2009; EVERAERTS; BECKERS; VERHEGGEN, 1976; BOCEK et al, 1985; RIGHETTI; BOSSI, 1997; RIGHETTI, 1983; SILVA, 2002; COLTRO, 2004).

1.5 Determinação simultânea de cátions e ânions

A presença do EOF tem um importante papel na CE, pois o fluxo de solução contribuiu significativamente para a automação da técnica permitindo a introdução de amostra e detecção diretamente no capilar. Quando a velocidade eletrosmótica é de grande magnitude, o fluxo é responsável pela condução de solutos, sem diferenciação de carga, em direção ao detector. Desta forma, a análise simultânea de amostras que contém espécies catiônicas, aniônicas e neutras é possível. No entanto, não haverá distinção temporal de espécies neutras (KOENKA et al, 2016) (WEEKLEY; FOLEY, 2007).

Esta característica é de extrema importância quando se trata da análise de fármacos, pois aproximadamente metade dessas moléculas farmacológicas que existem no mercado é formada por compostos iônicos (em forma de sais) (KOENKA et al, 2016). Estes fármacos devem ser analisados em várias etapas do processo farmacêutico, desde seu desenvolvimento, até o controle de qualidade final, e grande parte dessas propriedades físicas são definidas pelo par de íons que forma o composto.

Por isso, a determinação simultânea de cátions e ânions é importante, pois a possível presença de impurezas que podem ser provenientes da catálise do fármaco ou do processo de fabricação pode afetar as propriedades supracitadas, gerando efeitos indesejáveis no usuário do medicamento (DIONEX.com).

Uma técnica bastante utilizada no controle de qualidade de fármacos é a HPLC. Entre os tipos de cromatografia líquida existentes, a cromatografia de íons pode ser utilizada na determinação simultânea de espécies catiônicas e aniônicas utilizando-se simultaneamente colunas específicas para íons positivos e negativos (CALISEVICI et al, 2011) ou colunas de troca catiônica e aniônica (MENG et al, 2008) ou até colunas com polímeros de caráter anfótero como fase estacionária (CRAFTS et al, 2009). Porém, tudo isto requer uma instrumentação mais complexa (injetores duplos) e muitas vezes mais do que um tipo de eluente e/ou coluna (SAARINORDHAUS; ANDERSON, 1991).

A utilização da CE com detecção condutométrica (detecção utilizada no presente trabalho) na determinação simultânea de cátions e ânions contorna alguns obstáculos citados acima, sendo possível a análise simultânea utilizando uma única coluna. A determinação de espécies e seus contra-íons traz a possibilidade de se detectar impurezas e até mesmo processos de degradação do analito, além da possibilidade de se obter uma informação extra sobre a estequiometria dos compostos (THANH DUC; HAUSER, 2012). O desenvolvimento de métodos que permitam a separação simultânea de espécies aniônicas e catiônicas em CE é de grande interesse para que se minimize o tempo de trabalho e gasto com soluções.

Kubán e Karlberg introduziram estratégias que podem ser usadas na separação simultânea de cátions e ânions através de CE (KUBAN; KARLBERG, 2002). Uma estratégia compreendeu a injeção dupla da amostra onde os cátions injetados no polo positivo (ânodo) migram no sentido normal ao EOF e os ânions injetados no polo negativo

(cátodo) migram em sentido contrário ao EOF (WEEKLEY; FOLEY, 2007). Neste caso, o EOF é utilizado com uma velocidade baixa.

Existe outra possibilidade que é a utilização do EOF com velocidade de migração elevada ($\text{pH} > 7$), a fim de mover os analitos catiônicos e aniônicos na mesma direção (os íons lentos serão arrastados pelo EOF). Esta estratégia pode ser utilizada com o EOF normal (cátions e ânions lentos) ou com EOF invertido (ânions e cátions lentos) (JOHNS et al, 2004). Neste modo, que pode ser implementado em equipamentos comuns de CE, tanto cátions como ânions migram na mesma direção através do detector (GALLAGHER; DANIELSON, 1997; FORET; FANALI; OSSICINI, 1989; SHAMSI; DANIELSON, 1995).

Outra possibilidade, que não é tão simples, consiste na complexação de espécies catiônicas com um composto quelante, obtendo assim novas espécies carregadas negativamente, as quais podem ser separadas de modo convencional (EOF invertido) juntamente com outros analitos aniônicos (TOMOYOSHI; ROSS, 1999; SARAZIN et al, 2010; KROKHIN et al, 1997).

1.6 Sistemas de detecção em CE

O sistema de detecção em CE é de grande importância, pois uma técnica de separação com elevado desempenho necessita de um detector eficiente e adequado que complemente a técnica. O ideal é que o sistema de detecção seja o mais seletivo possível às espécies de interesse e também o de maior detectabilidade às mesmas.

Após mais de três décadas de introdução do formato atual de detecção em CE (MIKKERS; EVERAERTS; VERHEGGEN, 1979; JORGENSON; LUKACS, 1981), o desenvolvimento de novos sistemas de detecção continua em destaque devido à pequena

quantidade de material introduzida no capilar. Assim, artigos continuam sendo publicados abordando melhorias nos sistemas de detecção conhecidos e introduzindo novos conceitos. A priori os sistemas de detecção em CE seguem os mesmos esquemas utilizados em LC, sendo classificados em (DA SILVA, 2003):

- Métodos ópticos: Absorção de luz na região do ultravioleta-visível ou infravermelho, fluorescência, índice de refração, Raman absorbância termo-óptica e quimiluminescência;
- Métodos eletroquímicos: Amperométricos, voltamétricos, condutométricos e potenciométricos;
- Outros métodos e métodos acoplados: Ressonância magnética nuclear, radiométricos, espectrometria de massas e de emissão com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES).

Infelizmente, o método de detecção perfeito não existe, então considera-se que: os métodos de detecção fluorimétricos são mais sensíveis, porém, muitas das vezes, necessitam de derivatizações dos componentes das amostras antes da análise. Este procedimento pode agregar erros na etapa de preparo das amostras. A detecção indireta é uma alternativa, porém, neste caso, a sensibilidade é reduzida. (HENDERSON, 2009).

A amperometria é um modo de detecção sensível e possui, relativamente, boa seletividade, porém, o posicionamento (adaptação) do eletrodo de trabalho no sistema de CE sem que haja interferência do potencial aplicado para gerar o campo elétrico (usado na separação em CE) na corrente detectada no eletrodo de trabalho é dificultada (MARK; SCHOLZ; MATYSIK, 2012) (DA SILVA, 2003).

A espectrometria de massas é uma técnica que agrega sensibilidade e gera informações estruturais adicionais da molécula e pode ser empregado em CE. Esta técnica é muito utilizada quando se deseja realizar análise de produtos de degradação e

metabólitos. Porém, a técnica exige que o eletrólito de corrida seja, necessariamente, volátil e puro para esse tipo de detecção, gerando limitações em função do pH de trabalho (ŠOLÍNOVÁ; KAŠIČKA, 2006; ZEMANN, 2003).

O detector de absorção por UV-vis é o mais usado em sistemas CE (HAQUE; STEWART, 1999). Neste caso, comprimentos de onda são selecionados na região do espectro onde os analitos de interesse apresentam absorvidade ou ainda, de forma universal, onde um cromóforo presente no tampão de corrida é constantemente monitorado e analitos que não absorvem podem ser detectados indiretamente. Para aumentar a sensibilidade, uma célula do tipo “Z” muitas vezes é empregada ou então se remove o revestimento de poliimida do capilar de sílica fundida para que assim seja possível a passagem de radiação (ZEMANN, 2003). Este detector tem limitações na determinação de espécies não sensíveis ao UV-vis, especialmente para alguns cátions metálicos, como o zinco, presentes como co-íons em medicamentos, pois a maioria destes não apresentam absorção na região do espectro UV-Vis e o uso da detecção indireta apresenta limitações em função do pH (precipitação) necessário para manutenção da estabilidade do cromóforo adicionado ao BGE (NEHMÉ et al, 2010).

Em geral, os diferentes modos de detecção apresentam sensibilidades diferentes. O Quadro 1 apresenta alguns valores típicos de limites de detecção (LOD) de alguns dos detectores utilizados em CE.

Quadro 1 - Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.

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

Adaptado de (de CARVALHO, 2003).

1.7 Detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C⁴D)

Zahn iniciou a história da detecção condutométrica sem contato em 1928 (ZAHN, 1928), porém a detecção condutométrica aplicada a CE começou a ser estudada a cerca de 40 anos (VAN DER STEEN, 1972), sendo inicialmente empregado na isotacoforese. No ano de 1985, foi demonstrada a utilidade desses dispositivos para CZE (DEML; FORET; BOCEK, 1985), onde as zonas eram detectadas com o auxílio de detectores condutométricos. Em 1998, dois trabalhos independentes publicados por Zemmann e

colaboradores (ZEMANN et al, 2003) e Fracassi da Silva e do Lago (DA SILVA; DO LAGO, 1998) introduziram a detecção condutométrica sem contato (C^4D). Portanto, foram nas décadas de 80 e 90 que muitos trabalhos foram publicados abordando aspectos teóricos, construção e aplicações de detectores condutométricos em CE.

Uma grande vantagem da C^4D é o descarte da etapa de derivatização de espécies na amostra, necessária em UV-VIS no caso da amostra não absorver em nenhum comprimento de onda, o que simplifica sua preparação e reduz o tempo total de análise. Além disso, existe uma flexibilidade para a escolha do eletrólito de corrida (BGE). Em geral, a baixa condutividade do BGE (baixa mobilidade do co-íon) pode ser utilizada para a separação de analitos de alta mobilidade, com a vantagem da baixa geração de calor pelo efeito Joule.

A C^4D veio como uma alternativa aos detectores condutométricos convencionais (com contato), os quais necessitam de adaptações complexas no capilar (perfurações do capilar com laser de CO_2) para posicionar os dois eletrodos que compõem o detector (DA SILVA; DO LAGO, 2000). Devido o detector não entrar em contato com o BGE e nem com os padrões e amostras que fluem no interior do capilar, foi possível eliminar o risco de contaminação dos mesmos, assim como a diminuição considerável da interferência do campo elétrico usado na separação das espécies no sistema de CE, obtendo assim, melhor estabilidade e resposta analítica (BRITO-NETO et al, Part.1 e 2, 2005).

De forma simplificada, na detecção por C^4D , um sinal senoidal de elevada frequência (na ordem de milhares de Hertz) é aplicado a dois eletrodos de platina que estão posicionados ao redor do capilar. Quando esse sinal é aplicado em um desses eletrodos do detector, uma corrente elétrica é detectada no outro eletrodo (apesar de não haver contato entre os mesmos). Esta corrente elétrica que é detectada entre os dois eletrodos é proporcional à condutividade da solução que irá fluir no interior do capilar e entre os eletrodos. Essa corrente é então convertida em tensão alternada, com posteriores etapas de

retificação e amplificação, e através de uma placa conversora analógico-digital gera um registro que pode ser interpretado e trabalhado através de softwares. Como a corrente medida é uma propriedade da solução, a detecção não apresenta seletividade, o que, de certa forma, é uma vantagem quando aplicada a técnicas de separação (detector universal). Um esquema deste funcionamento está representado na Figura 8.

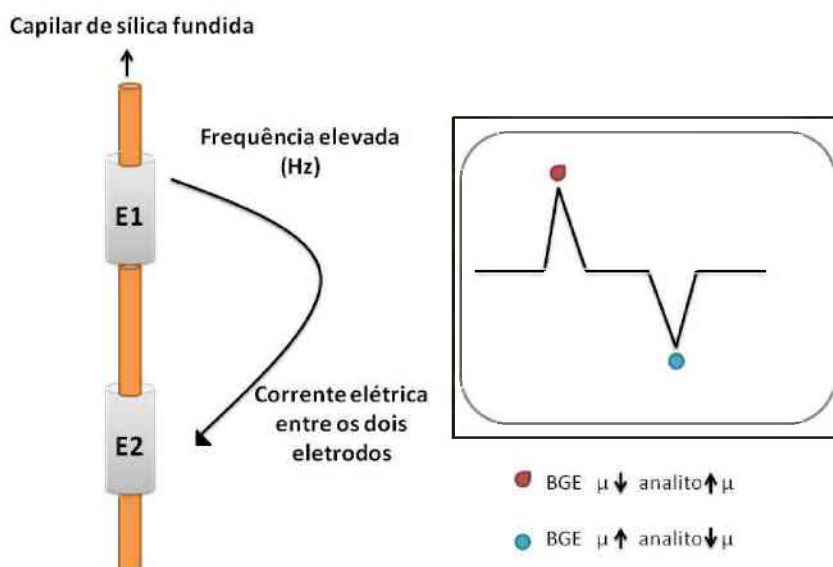


Figura 5 - Esquema do sistema de detecção C⁴D e representação de um eletroferograma com pico positivo e pico negativo. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.

Uma frequência ótima de trabalho deve ser estudada para um funcionamento adequado do detector, pois dependendo do valor, a resistência da solução no interior do capilar (que pode ser determinada através da corrente que flui entre os eletrodos) deixa de ser detectada e o detector não cumpre o papel de notar variações na condutância (BRITO-NETO et al, Part.1 e 2, 2005).

O mecanismo da detecção de espécies em C⁴D é relativamente simples. Ele baseia-se na substituição do co-íon presente no BGE pelo íon a ser analisado. Por exemplo, quando a mobilidade (μ) do analito for maior que a do co-íon do BGE ocorre um aumento da

condutividade na região do capilar e o detector é sensibilizado, obtendo o registro de um pico positivo no eletroferograma. O contrário também é válido, no caso em que o co-íon do BGE possuir maior mobilidade que o íon do analito, o resultado será um pico negativo no eletroferograma, este esquema pode ser observado na Figura 8. Quanto maior for a diferença de mobilidade do BGE em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector, por isso o BGE possui papel fundamental na sensibilidade de cada analito. O grande pico (geralmente negativo) que é observado nos eletroferogramas com detecção por C^4D , se refere à detecção da água juntamente com outras espécies neutras que co-migraram com a água e que é o marcador do EOF. A água, em geral, tem uma menor mobilidade do que a mobilidade de qualquer BGE utilizado.

Este tipo de detecção também pode ser incorporado em microchips, onde é coberto com uma camada de isolamento e colocado sob o fundo ou na parte superior do dispositivo. Devido à geometria dos dispositivos, a separação planar dificulta ou impossibilita a formação de eletrodos tubulares em torno do canal. Desta forma, a capacitância de acoplamento é inferior à dos capilares convencionais. Do mesmo modo, a blindagem eficaz entre os eletrodos também é difícil e por estas razões, a presença de um sinal de fundo significativo está normalmente presente no microchip, o que influencia de forma adversa no sinal-ruído do analito (KUBA'N; HAUSER, 2008).

Mais detalhes sobre os aspectos fundamentais da CE- C^4D podem ser encontrados em artigos de revisão publicados recentemente por Brito-Neto e colaboradores (BRITO-NETO et al, Part.1 e 2, 2005), Kuba'n e Hauser (KUBA'N; HAUSER, Part.1 e 2, 2004) (KUBA'N; HAUSER, 2005) e Johnston e colaboradores (JOHNSTON et al, 2005), além das referencias já citadas anteriormente neste tópico.

1.8 Análises rápidas por CE

Dois procedimentos são comumente usados para tornar as análises mais rápidas em CE: (1) uso de instrumentos com vários capilares (MARSH; ALTRIA, 2006), o qual permite realizar separações de várias amostras simultaneamente e, (2) utilização de capilares com comprimentos reduzidos (OPEKAR; COUFAL; STULIK, 2009). Um aumento do potencial aplicado ou redução do comprimento do capilar e seu diâmetro interno, reduzem significativamente os tempos de migração das espécies, como mostra a Equação 6, onde (l) é o comprimento efetivo do capilar, (L) é o comprimento total do capilar e (E) é o campo elétrico aplicado.

$$\text{Equação 6: } t_m = \frac{lL}{E (\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

A frequência analítica de um método nem sempre é colocado em primeiro plano. Geralmente, a busca por seletividade e sensibilidade se sobrepõe ao tempo de análise e, métodos analíticos que possuem menores LOD's e melhor seletividade se destacam, mesmo sendo mais demorados.

Uma técnica se torna bastante atrativa quando se alcança elevadas frequências analíticas, mesmo não possuindo uma sensibilidade tão baixa. Isto, porque a sensibilidade adquirida no método é suficiente para a quantificação na amostra analisada, com qualidade igual ou até superior aos métodos já consolidados e de referência (como o HPLC).

A CE-C⁴D tem sido muito utilizada em análises com elevadas frequências analíticas. Como exemplos podemos citar a determinação de etambutol e seu produto de degradação menos de 3 minutos (da SILVA et al, 2010), de codeína e diclofenaco em menos de 1 minuto (GIMENES et al, 2013), de escapolamina, orfenadrina, cafeína, dipirona e ácido

ascórbico em menos de 1 minuto (MARRA, 2014), de cafeína, paracetamol e ibuprofeno em 2 minutos (CUNHA et al, 2015).

A detecção UV-Vis também vem sendo empregada em CE no desenvolvimento de métodos rápidos de análise. Como exemplos, podemos citar a determinação de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} em amostras de biodiesel em 36 segundos (PIOVEZAN *et al*, 2010), a determinação de fosfato de oseltamivir no medicamento Tamiflu® em menos de 1,5 minutos (LABORDE-KUMMER et al, 2009), de arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico em 5 segundos (HAPUARACHCHI; PREMEAU; ASPINWALL, 2006) e a determinação de metil, etil, propil e o butilparabeno em cosméticos e formulações farmacêuticas em menos de 1 minuto (DOLZAN et al, 2013).

Existem também um número considerável de trabalhos que relatam análises rápidas utilizando a CE em microchips. Coltro e colaboradores (COLTRO; da SILVA; CARRILHO, 2010) relatam o desenvolvimento de um microchip acoplado a C^4D onde é feito a determinação simultânea de Na^+ , K^+ e Li^+ em menos de 30 segundos. Outro trabalho demonstra a análise simultânea de quatro íons inorgânicos (Cl^- , NO_3^- , NO_2^- e SO_4^{2-}) realizada em 120 segundos (FREITAS; TAVARES; COLTRO, 2016). Um trabalho utilizando CE em microchips acoplado a C^4D determina glifosato e seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em aproximadamente 60 segundos (da SILVA et al, 2013). A literatura também relata a determinação de BRCA1 e BRCA2 em um estudo sobre o câncer de mama, utilizando a eletroforese em microchips com detecção por fluorescência, onde a análise é feita em 120 segundos (TIAN et al, 2000). A gama de trabalhos com tempos de análises desde alguns segundos até poucos minutos é bastante extensa e tem sido um grande atrativo para a expansão e consolidação da técnica na sociedade científica. Informações mais detalhadas sobre o estado da arte em relação a este

tema pode ser obtida em artigos publicados recentemente (SAKO; DOLZAN; MICKE, 2015), (PIOVEZAN *et al*, 2010), (VITALI *et al*, 2011).

1.9 Espécies estudadas

Neste trabalho foram estudadas sete diferentes espécies, associadas de diferentes formas em formulações farmacêuticas comerciais. Dentre elas estão a difenidramina (DIF), piridoxina (PIR), 8-cloroteofilina (CTF), nafazolina (NAF), feniramina (FEN), clorfeniramina (CFEN) e o zinco (Zn). A associação de princípios ativos em fármacos trazem vantagens terapêuticas, porém gera novos desafios para a indústria farmacêutica, tanto com relação à estabilidade dos fármacos na associação, quanto na dificuldade analítica no controle de qualidade. Surge assim a necessidade de desenvolvimento de métodos capazes de quantificar princípios ativos em formulações farmacêuticas compostas (associação de dois ou mais fármacos).

1.9.1 Difenidramina (DIF) e 8-cloroteofilina (CTF)

A DIF ou 2-(difenilmetoxi)-*N,N*-dimetil-etanamina é uma amina terciária que está classificada dentro do grupo das etanolaminas, Figura 9a. A molécula é um anti-histamínico de primeira geração, ou seja, um antialérgico de rápida absorção e metabolização. A DIF tem a função de antagonizar os efeitos dos receptores H1 da histamina, causadora de fenômenos anafilático e alérgico, reduzindo sintomas de coceira, inchaço, vermelhidão ou corrimento nasal (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN 2001).

A CTF ou 8-cloro-1,3-dimetil-2,3,6,7-tetraidro-1H-purina-2,6-diona, Figura 9b, é uma droga estimulante da família das xantinas. A CTF costuma ser combinada com outras drogas para formar sais estáveis, como o dimenidrato, que é a combinação equimolar (1:1)

com a DIF. Este medicamento (popularmente conhecido como “*dramin*”) é vendido sem prescrição médica e é utilizado em combate a náuseas e vômitos (HALPERT; OLMSTEAD; BENINGER, 2003).

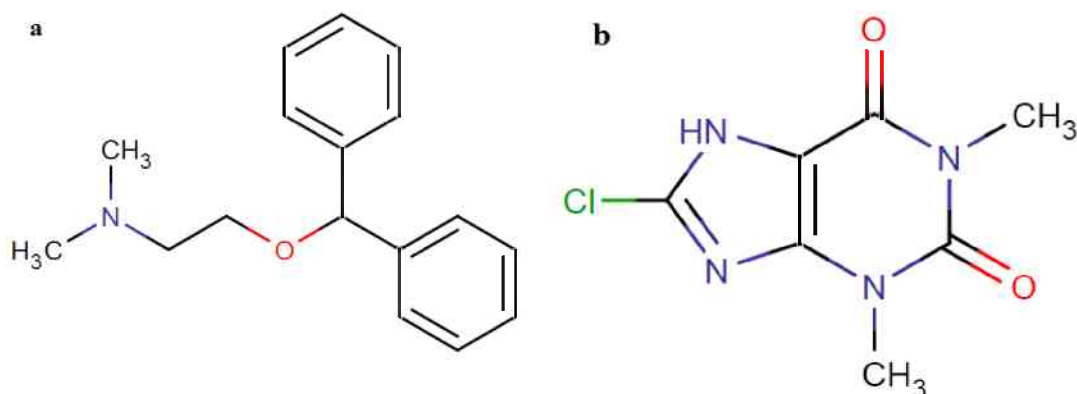


Figura 6 – Fórmula estrutural da (a) DIF ($pK_a = 8,9$) e (b) CTF ($pK_a = 5,1$). Fonte: chemicalize.org

Na literatura foram encontrados apenas dois trabalhos com a determinação simultânea de DIF e CTF, por cromatografia líquida com detecção UV (BARBAS et al, 2000) (DOGE; EGER, 2007) e por método eletroquímico empregando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica (FREITAS et al, 2014).

1.9.2 Piridoxina (PIR)

A PIR ou 4,5-bis(hidroximetil)-2-metilpiridin-3-ol ou ainda vitamina B6, Figura 10, faz parte do grupo das vitaminas B e é fundamental tanto para a saúde física quanto mental, pois ela é essencial para a formação das células vermelhas do sangue, além de auxiliar nas principais funções vitais. A PIR é necessária tanto pelo metabolismo de proteínas quanto para o bom funcionamento do sistema nervoso e imunológico (QU; WU;

HU, 2004). A PIR é eficaz no controle de náuseas e vômitos em mulheres grávidas (HALPERT; OLMSTEAD; BENINGER, 2002).

Na literatura foram encontrados alguns trabalhos que fazem a determinação de piridoxina: por análise espectrofotométrica com injeção em fluxo em formulações farmacêuticas (ANICETO, C; FATIBELO-FILHO, O. 1999), por determinação voltamétrica (TEIXEIRA et al, 2004), por método espectrofluorimétrico (ESCANDAR; BYSTOL; CAMPIGLIA, 2002), por quimioluminescência em amostras farmacêuticas (ALWARTHAN; ALY, 1998).

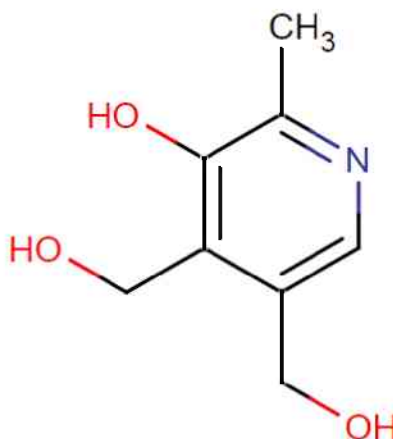


Figura 7 – Fórmula estrutural da PIR (pKa = 5,6 e 9,4). Fonte: chemicalize.org

1.9.3 Nafazolina (NAF)

A NAF de fórmula molecular 2-(1-naftilmetil)-2-imidazolina, Figura 11, é uma droga simpatométrica, e é encontrada em formulações farmacêuticas de administração nasal e ocular (BUCARETCHI; DRAGOSAVAC; VIEIRA, 2003). Este composto possui propriedades vasoconstritoras e descongestionantes com atividade sobre os receptores alfa-adrenérgicos nas arteríolas da conjuntiva induzindo a vasoconstrição, isto resulta na diminuição na congestão conjuntival, ou seja, na dilatação dos vasos sanguíneos na conjuntiva causada pela inflamação (HERBERTS et al, 2006).

O cloridrato de nafazolina age nas mucosas de forma rápida e com duração prolongada na redução do inchaço e da congestão, assim é utilizado para os sintomas de rinite, sinusite e para a descongestão da conjuntiva ocular. O uso excessivo de NAF pode causar sintomas por intoxicação como, sonolência, sudorese, hipotensão ou choque, bradicardia, depressão respiratória, pois seu efeito não ocorrerá apenas na região aplicada, outros vasos podem ser obstruídos, devido a um efeito sistêmico (BUCARETCHI; DRAGOSAVAC; VIEIRA, 2003).

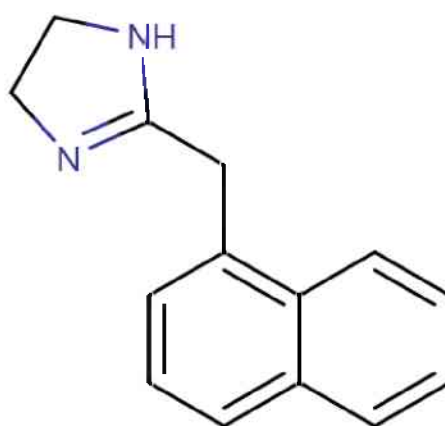


Figura 8 – Fórmula estrutural da NAF ($pK_a = 10,2$). Fonte: chemicalize.org

Na literatura são encontrados alguns trabalhos que fazem a determinação de NAF em fármacos, como por espectrofotometria (GOICOECHEA; OLIVIERI, 2002), HPLC-UV (SÁSA; AL-MOMANI; JALAL, 1990), eletroforese capilar (MARCHESINI et al, 2003), fluorescência (CASADO-TERRONES et al, 2005), fosforescência (DÍAZ et al, 2004), método eletroquímico usando eletrodo impresso (EL-DIEN et al, 2012).

1.9.4 Feniramina (FEN) e Clorfeniramina (CFEN)

A FEN ou N,N-dimetil-3-fenil-3-piridin-2-il-propan-1-amina, Figura 12a, e a CFEN ou 3-(4-clorofenil)-N,N-dimetil-3-piridin-2-il-propan-1-amina, Figura 12b, são anti-histamínicos clássicos que bloqueiam reversível, seletiva e competitivamente os receptores

H1, por apresentarem semelhança estrutural com a histamina. Os dois são utilizados em preparações para o tratamento de alergias e infecções respiratórias, rinite, erupções cutâneas e prurido (CRIADO et al, 2010).

Os anti-histamínicos são classificados segundo o receptor com o qual interagem, sendo aqueles que atuam preferencialmente no receptor H1, chamados anti-H1. Os anti-H1 estão entre os fármacos mais prescritos no mundo e, embora apresentem eficácia semelhante no tratamento de pacientes com rinoconjuntivite alérgica, urticária e outras doenças alérgicas, diferem de forma importante quanto à sua estrutura química, farmacologia clínica e potencial de toxicidade (SIMONS, 2002).

A literatura apresenta alguns métodos analíticos para a determinação quantitativa de FEN e CFEN como, espectrofotometria (ONUR, 2000), HPLC (DEWANI et al, 2012), GC (MARTENS, 1995) e CE (MIKUŠ; VALÁŠKOVÁ; HAVRÁNEK, 2005) e voltametria cíclica utilizando eletrodo de carbono vitreo modificado com SDS (LAMANI et al, 2011).

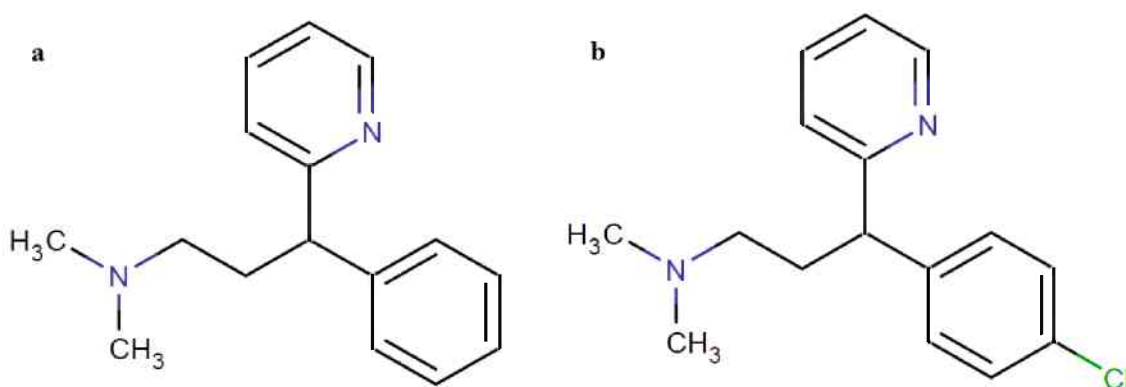


Figura 9 – Fórmula estrutural da (a) FEN e (b) CFEN ($pK_{a1} = 3,6$ e $pK_{a2} = 9,5$). Fonte: chemicalize.org

1.9.5 Zinco

O sulfato de zinco, mesmo não sendo considerado um vasoconstritor, ajuda no alívio de irritações oculares leves e é considerado como um agente bacteriostático de potencial moderado (SHIMAZAKI; SAKATA; TSUBOTA, 1995). Ele é um adstringente

oftálmico de ação moderada que proporciona um efeito calmante e lavagem da superfície ocular. A sua forma de ação pode ser considerada como removedora da camada superficial de muco ocular, promovendo efeito calmante (DOUGHTY, 1997).

O sulfato de zinco é amplamente empregado como componente essencial em diversas formulações oftálmicas, tanto sozinho, como combinado com NAF ou FEN (MANOURI et al, 1998).

A determinação de Zn em soluções oftalmológicas é relatada de várias formas na literatura, como por espectrofotometria (MANOURI et al, 1998), voltametria de redissolução (LUTKA; BUKOWSKA, 2009), polarografia (WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ; FIJALEK, 1998) e espectroscopia de absorção atômica (MOODY; TAYLOR, 1972).

1.10 Formulações farmacêuticas estudadas

Neste trabalho foram estudadas cinco formulações farmacêuticas diferentes: (I) DIF + CTF + PIR; (II) NAF + DIF; (III) NAF + FEN; (IV) NAF + CFEN; (V) NAF + Zn. Normalmente, dois ou mais princípios ativos estão presentes em uma mesma formulação devido à existência de efeitos aditivos ou sinérgicos. Conceitualmente, um efeito aditivo refere-se à interação entre duas drogas de tal forma que, quando co-administradas, o efeito resultante aproxima-se ao efeito máximo ou a soma dos efeitos das duas drogas administradas individualmente. Sinergismo descreve a interação entre duas drogas, tal que, quando administradas concomitantemente, a eficácia ou potência resultante suporta uma interação maior do que aditivo ou multiplicativo comparado com cada fármaco administrado individualmente (RAFFA; STONE; TALLARIDA, 2000).

A DIF tem a capacidade de reduzir a náusea, e a presença de CTF (estimulante do sistema nervoso central) diminui um pouco a sonolência induzida pela DIF (HALPERT; OLMSTEAD; BENINGER, 2002). Além disso, estudos posteriores demonstraram que, com a adição de piridoxina PIR, que é o terceiro princípio ativo, gera uma melhor eficácia para o controle de náusea e vômito no início da gravidez (ANVISA, 2009; QUINLAN; HILI, 2003).

Com relação às formulações com NAF, a eficácia de vasoconstritores e/ou anti-histamínicos de ação direta pode ser aumentada quando utilizado em combinação com sulfato de zinco (ação adstringente) (DOUGHTY, 1997). Na combinação com a FEN ou CFEN, que atua provocando a vasodilatação, aumenta-se da permeabilidade vascular (eritema e edema) e estimulação das terminações nervosas sensoriais (SIMONS, 2003). As combinações destes pares resultam em medicamentos que são utilizados como solução oftalmológica. Quando associada com a DIF, a ação da NAF é mais eficaz no alívio de sintomas de gripe como obstrução nasal, coriza e espirros do que apenas a NAF isolada, pois além da redução da resistência à passagem do ar pelas narinas, há a antagonização do efeito da histamina pela DIF reduzindo sintomas como o corrimento nasal (ADNAX, Bula de remédio). A combinação destes dois fármacos resulta num medicamento utilizado no alívio de sintomas de gripe como obstrução nasal, coriza e espirros.

Na literatura foi encontrado apenas um trabalho que demonstra a possibilidade de determinação simultânea de DIF, CTF e PIR. O método é eletroquímico e faz a análise por injeção em batelada com detecção por amperometria de múltiplos pulsos (FREITAS et al, 2015).

A determinação simultânea de NAF e FEN é relatada apenas por HPLC (HUANG et al, 2014) e a determinação simultânea de NAF e CFEN foi demonstrada por HPLC e por métodos espectrofotométricos (ALI et al, 2013) (SAYED et al, 2013). A possibilidade de

determinação simultânea de NAF e Zn foi demonstrada em apenas um trabalho por análise com injeção em batelada (OLIVEIRA et al, 2016). A determinação simultânea de NAF e DIF juntamente com uma terceira molécula (fenilefrina) foi feita via eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção UV-vis (arranjo de diodos) (MARCHESINI et al, 2003). Outro trabalho demonstra a determinação de NAF e DIF por espectroscopia UV-visível (SANTONI, 1989).

Contudo, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura para a determinação simultânea das cinco formulações via CE-C⁴D.

O controle de qualidade de fármacos é de grande importância para obtenção de autenticidade dos produtos introduzidos no mercado ou evitar possíveis adulterações e falsificações. A presença de dois ou mais princípios ativos na mesma formulação limita o uso de diversas metodologias de análise disponíveis na literatura ou em Farmacopeias.

Dentro deste contexto, estudos para o desenvolvimento de metodologias que possibilitem determinações simultâneas a um custo menor e com a manutenção da qualidade dos resultados são de grande importância.

A obtenção de sucesso nos objetivos propostos neste trabalho pode permitir que no futuro a técnica e metodologia sejam consolidadas, e empresas com menor poder aquisitivo possam implantar estas metodologias de controle de qualidade, pois os custos de aquisição, de operação e de manutenção são consideravelmente inferiores se comparada, por exemplo, com a HPLC que é uma técnica de separação amplamente utilizada e que hoje é a técnica recomendada pela Farmacopeia Americana quando se trata da análise de fármacos que possuem mais de um princípio ativo (FAMACOPEIA AMERICANA, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos utilizando a CE-C⁴D. O foco principal é a obtenção de métodos com elevada frequência analítica, custo reduzido e baixo consumo de amostras e reagentes.

2.2 Objetivos Específicos

Quantificação rápida e simultânea, utilizando a CE-C⁴D, de:

- Difenidramina, piridoxina e 8-cloroteofilina;
- Nafazolina e difenidramina;
- Nafazolina e feniramina;
- Nafazolina e clorfeniramina;
- Nafazolina e zinco.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes foram de grau analítico, sendo utilizados sem purificação prévia. A água deionizada (18 MQ cm^{-1}) foi obtida a partir de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). No Quadro 2 estão listados todos os reagentes e empresas dos quais foram adquiridos.

Quadro 2 - Relação de reagentes e empresas onde foram adquiridos.

Reagentes	Empresas
8-cloroteofilina (CTF)	Alfa Aesar (Ward Hill, USA)
Acetonitrila	Merck (Darmstadt, Germany)
Ácido 2-(morfolin-4-il)etano-1-sulfônico (MES)	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico (DMX)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Ácido Bórico	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Ácido fosfórico	Merck (Darmstadt, Germany)
Clorfeniramina (CFEN)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Difenidramina (DIF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Dimenidrinato (DM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Etanol	Química Moderna (Barueri, Brasil)
Feniramina (FEN)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Hidrocloridrato de nafazolina (NAF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Hidróxido de sódio (NaOH)	Dinamica (Diadema, Brasil)
Histidina (HIS)	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Metanol	Synth (Diadema – Brazil)
Piridoxina (vitamina B6) (PIR)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Trietanolamina (TEA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Zinco metálico (Zn)	Synth (Diadema – Brazil)

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza (P. A) superiores a 98%, com exceção do ácido fosfórico que possui P. A de 85%.

Todos os padrões e amostras (líquidas) foram preparados apenas por diluição em água deionizada até a concentração desejada. Apenas na preparação da solução de dimenidrinato (sal de CTF + DIF), a adição de 20% de etanol era necessária para completa dissolução do sal. Além disso, todas as soluções amostra e padrão foram mantidos sob ultra-som durante 10 min para completa solubilização, além disso, as amostras foram filtradas antes de inseridas no equipamento.

As recuperações dos três métodos foram calculados utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de recuperação} = |C_{\text{final}} - C_{\text{amostra}}| / C_{\text{adicionada}} \times 100$$

onde: C_{final} : Concentração analisada na amostra após a adição; C_{amostra} : Concentração original da amostra; $C_{\text{adicionada}}$: Concentração adicionada.

3.2 Instrumentação

Todos os eletroferogramas foram obtidos utilizando um equipamento de CE construído no laboratório do Prof. Caludimir Lúcio do Lago, no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP. O equipamento possui dois detectores condutométricos compactos sem contato acoplados capacitivamente (CE-C⁴D) (DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009). O equipamento de CE usado neste trabalho possui dois destes detectores como pode ser visualizado na Fig. 10 (a) e também um esquema do modo de injeção utilizada nos trabalhos na Fig. 10 (b).

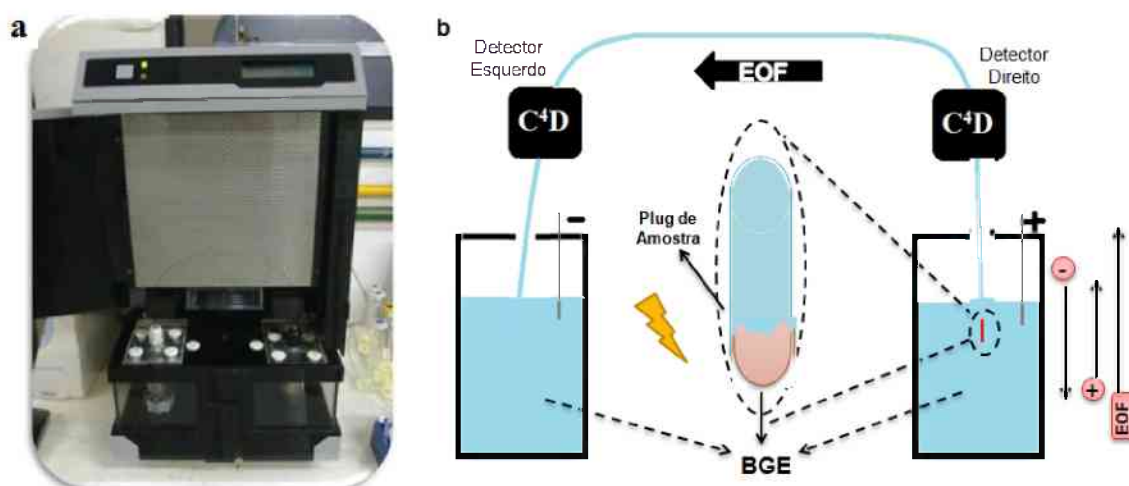


Figura 10 – (a) Imagem do equipamento usado no laboratório; (b) Esquema do sistema e modo de injeção usado nesse trabalho.

As injeções foram feitas no lado direito do equipamento. Os detectores estão posicionados ao longo do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida utilizado em todos os experimentos tinha em torno de 40 ou 50 cm de comprimento total, 50 μm de diâmetro interno e de 375 μm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA, EUA). Desta forma, no primeiro detector, o comprimento efetivo do capilar era de 10 cm e no segundo de 30 ou 40 cm. Antes das análises, o capilar foi pré-condicionado por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos, em seguida com água deionizada durante 10 minutos e, finalmente, com o BGE a ser utilizado nos experimentos durante 10 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (com pressão constante de 25 kPa) por 1,5 s na determinação de DIF, PIR e CTF; por 1,0 s na determinação de NAF e Zn e por 1,25 s na determinação de NAF e DIF, NAF e FEN e NAF e CFEN. Todos os ensaios foram realizados com a aplicação de uma diferença de potencial de +25 kV (lado da injeção).

Nas análises por HPLC para a determinação de DIF, PIR e CTF foi utilizado um equipamento Shimadzu LC-10 VP com um detector UV-Vis (SPD-10AV), uma coluna LC

(Lichrospher 100 A8 RP18- C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), um desgaseificador (DGU-20A5), um injetor manual (20 μ L) e uma bomba (LC-10AD-VP). A fase móvel consistiu na mistura de (78:22, v/v) de acetonitrila e uma solução aquosa de H_3PO_4 (0,01 mol L^{-1}) (o pH foi ajustado para 2,8 com trietilamina). O comprimento de onda usado foi de 229 nm. O vazão era de 1,0 mL min^{-1} (DOGE; EGER, 2007).

Na determinação da NAF por HPLC, foi utilizado o equipamento Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector UV-VIS (SPD-10AV), coluna cromatográfica com fase estacionária C18 (Phenomenex 110A° Gemini-C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), uma bomba de duplo pistão LC-10AD-VP e injetor manual com alça de amostragem de 20 μ L. A fase móvel foi composta por tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 2,8, corrigido com trietilamina) e metanol, na proporção 68:32 (v/v). O comprimento de onda fixado para detecção foi 280 nm e o fluxo da fase móvel empregado foi de 1,0 mL min^{-1} , de acordo com o trabalho de (HUANG et al., 2014).

Os resultados obtidos na determinação de Zn por CE foram comparados aos obtidos por absorção atômica por chama (FAAS). Neste procedimento foi usado um equipamento modelo Varian® SpectrAA 220 (Victoria, Australia), cujas condições operacionais utilizadas foram: Linha analítica utilizada de 213,9 nm; largura da fenda de 0,7 nm; corrente da lâmpada de 10 mA; largura do queimador de 10 cm; vazão do fluxo de acetileno de 1,25 L min^{-1} e vazão do fluxo de ar de 5,25 L min^{-1} (MANOURI et al., 1998).

As amostras contendo NAF + DIF, NAF + FEN e NAF + CFEN também foram analisadas por HPLC. Este sistema possui uma coluna de 15 cm (Phenomenex), vazão de 1,0 mL min^{-1} , volume de 20 μ L injetado e o detector de arranjo de diodos (LC-10AD-VP). A fase móvel foi adaptada de (BARBAS, 2000) (HUANG et al., 2014) onde era composta por tampão fosfato e metanol (45:55 v/v) com pH ajustado para 7,0 com trietilamina. Para a detecção de cada espécie definiu-se os melhores comprimentos de onda, em relação a

DIF o comprimento de onda com máxima absorção foi de 210 nm, NAF 281 nm e para FEN e CFEN 262 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação simultânea de DIF, PIR e CTF.

De acordo com os dados obtidos na literatura (SWAIN, 2012), os valores de pKa dos analitos estudados são os seguintes: DIF = 8,9, PIR = 5,6 e 9,4, e CTF = 5,1 (Fig. 11).

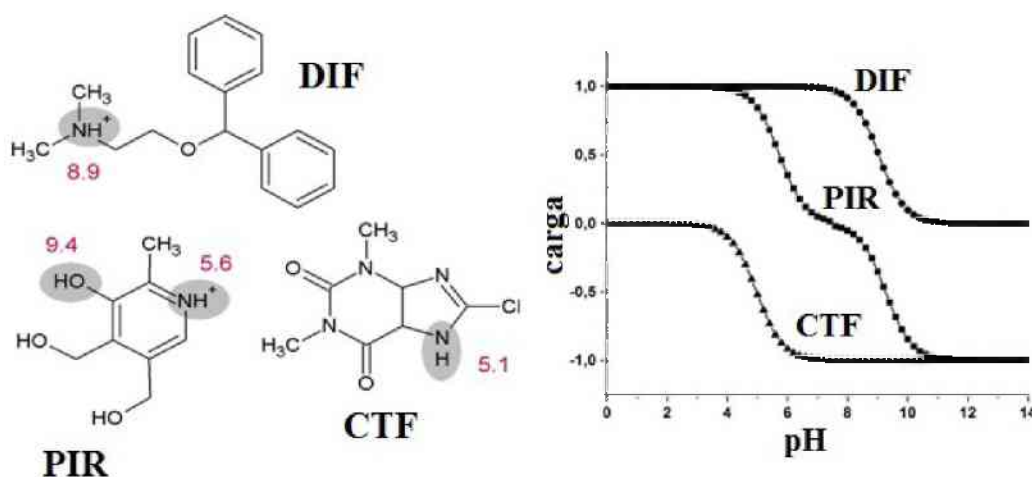


Figura 11 – Estruturas e valores de pKa da difenidramina (DIF), piridoxina (PIR) e 8-cloroteofilina (CTF) (SWAIN, 2012) e as curvas da relação de carga versus pH (●; DIF), (■; PIR) e (▲; CTF) (GUTZ, 2012).

Estes valores indicam que os três compostos podem existir nas suas formas iônicas em soluções aquosas e, portanto, podem ser separados por eletroforese capilar de zona (CZE). A DIF apresenta um caráter básico fraco e existe na forma catiônica em soluções com pH inferior a 10,9. Já a CTF apresenta um caráter de ácido fraco e existe na forma aniônica em soluções com pH superior a 3,0. Por outro lado, a PIR é uma molécula anfótera ($pI = 7,5$) e pode existir tanto na sua forma catiônica ($pH < 7,5$) quanto na sua forma aniônica ($pH > 7,5$). Além disso, duas espécies agindo de forma simultânea devem ser consideradas na separação eletroforética usando BGEs com pH próximo dos valores de

pKa: a molécula do ácido ou da base não-ionizados (com mobilidade zero) e a sua base conjugada (ânion) ou o ácido conjugado (cátion), respectivamente. Ambas as espécies, devido ao rápido equilíbrio ácido-base, migram no campo elétrico como um único soluto, de acordo com a sua mobilidade efetiva. A fim de conseguir a separação de todos os analitos simultaneamente, uma condição que permitisse a separação simultânea de cátions e dos ânions por CZE foi avaliada.

Uma análise das curvas de carga versus pH (Fig. 11) permite uma avaliação preliminar das faixas de pH onde a separação não é possível por CZE. A CTF quando em $\text{pH} < 4$, a DIF em um $\text{pH} > 10$, e a PIR no intervalo de pH entre 6,5 - 8,2 não estão ionizadas, ou seja, estão com mobilidade zero, ou então muito pouco ionizadas. Apenas em duas faixas de pH, a separação pode ser possível (4,5 - 6,4 ou 8,3 - 9,9). Na primeira faixa de pH citada (4,5 - 6,4), a análise seria mais lenta devido aos grupos silanóis, presentes na parede do capilar de sílica fundida estarem pouco ionizados (EOF com baixa mobilidade).

Desta forma, a estratégia adotada neste trabalho para a determinação rápida e simultânea dos três compostos por CZE foi o uso de EOF normal com alta mobilidade ($\text{pH} \geq 7,5$, quase 100% dos grupos silanóis ionizados). Nesta condição, cátions irão migrar rapidamente em direção do detector (EOF normal + mobilidade eletroforética) e ânions com mobilidade eletroforética reduzida serão levados até o detector pelo EOF (mobilidade do EOF \gg mobilidade eletroforética). Nesta condição, os cátions (DIF) serão detectados antes do EOF e os ânions (PIR e CTF) detectados imediatamente após o pico do EOF (água + moléculas neutras; C^4D).

Inicialmente foi feito um estudo da faixa de pH utilizando o BGE composto por 10 mmol L^{-1} de trietanolamina (TEA) com o pH ajustado com ácido oxálico (OXA), Fig. 12.

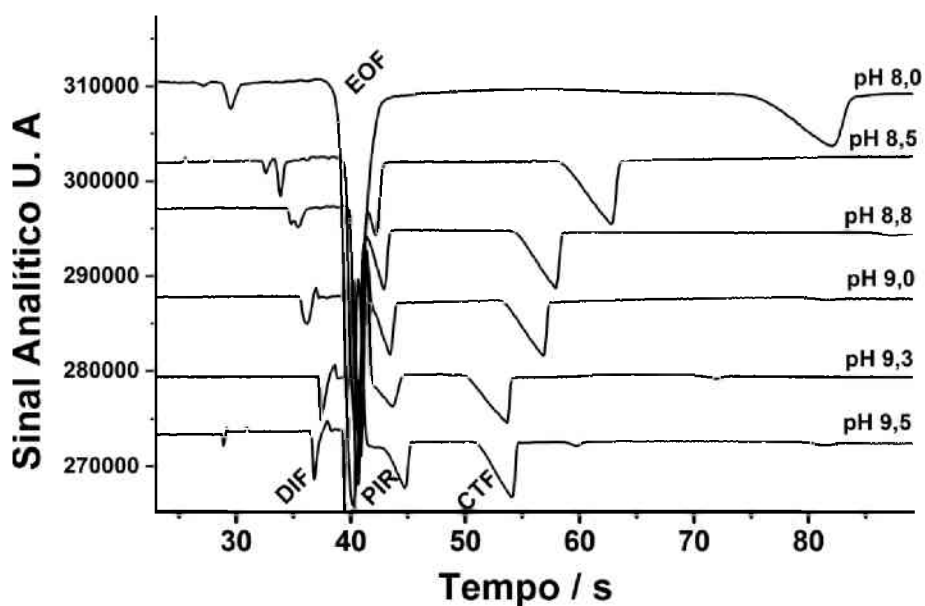


Figura 12 - Efeito da variação de pH na separação de DIF, CTF e PIR por CZE. Concentrações dos analitos: $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10mmol L^{-1} de TEA com pH ajustado com OXA; Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

A separação dos três compostos foi possível em um $\text{pH} = 9,5$. Os eletroferogramas mostram que o pico da DIF se aproxima do sinal do EOF com o aumento do pH do BGE (8,0 a 9,5), pois as moléculas na sua forma protonada (cátions) são convertidos na sua forma neutra. Por outro lado, o pico da PIR só foi detectado a um $\text{pH} \geq 9,5$. Para valores de $\text{pH} < 9,5$, a mobilidade da PIR não é suficiente para a separação do EOF por CZE (presença de percentual pequeno de espécies carregadas). A molécula de CTF pode ser detectada em toda a gama de pH estudada (8,0 - 9,5), porque existe em sua forma aniônica nesta faixa de pH ($\text{pK}_a = 5,1$).

Posteriormente, os efeitos de diferentes composições de BGE's sobre a eficiência de separação das três moléculas (Fig. 13) foram estudados com: 10 mmol L^{-1} de

trietanolamina (TEA) com o pH ajustado em 9,5 com os seguintes reagentes: (A) β -alanina; (B) ácido oxálico (OXA); (C) CHES; (D) ácido Acético (HAc); (E) Ácido Clorídrico (HCl); (F) Ácido 3,4-dimetoxinâmico (DMX) e (G) Ácido fosfórico (HFos).

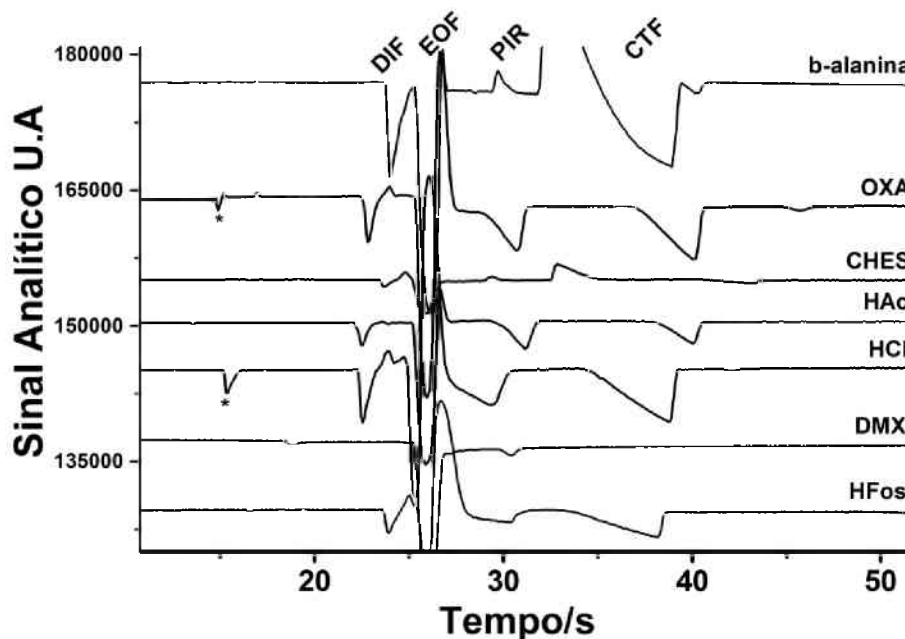


Figura 13 - Efeito da variação da composição do BGE na separação de DIF, CTF e PIR por CZE. Concentrações dos analitos: $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10mmol L^{-1} de TEA com pH ajustado em 9,5 com: (a) β -alanina; (b) OXA; (c) CHES; (d) HAc; (e) HCl; (f) DMX e (g) HFos. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Observa-se que os BGE's compostos por TEA e OXA ou HAc ou HCl apresentaram as melhores separações entre os analitos em estudo, inclusive com comportamentos semelhantes.

Com os resultados obtidos, a princípio, favoráveis para as três diferentes composições de BGE já citadas (Fig. 12) optou-se pela realização de alguns estudos com

os três BGE's compostos por TEA + OXA, TEA + HAc e TEA + HCl, a fim de definir o que apresentasse as melhores condições e resultados para a determinação simultânea de DIF, PIR e CTF. Parâmetros como: faixa linear de resposta, repetibilidade, limites de detecção, resolução e tempo de migração foram estudados. Todos estes resultados estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1 – Características analíticas estudadas para três diferentes composições de BGE's na determinação simultânea de DIF, PIR e CTF.

	TEA + OXA			TEA + HAc			TEA + HCl		
	DIF	PIR	CTF	DIF	PIR	CTF	DIF	PIR	CTF
T_m	25	32,4	40,7	22,8	30,0	38,4	25,0	32,5	39,7
R	0,963	0,849	0,984	0,989	0,999	0,991	0,985	0,993	0,984
FL	150-1400	75-700	150-1400	100-1400	50-700	100-1400	150-1400	75-700	150-1400
LD	44	48	51	35	18	34	49	18	19
r	1,9	3,2	5,2	1,8	2,9	5,6	2,5	4,1	5,5

T_m= Tempo de migração (s); R = Coeficiente de correlação; FL= Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$); LD= Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$); r = Resolução.

Como pode ser observado na Tab. 1, os três BGE's apresentaram desempenhos similares em relação ao tempo de migração, faixa linear, limite de detecção e resolução. No entanto, com o BGE composto por TEA e HAc, melhores coeficientes de correlação foram obtidos para a DIF, PIR e CTF. Desta forma, o BGE com TEA + HAc foi utilizado na análise de uma formulação farmacêutica (Fig. 14) que continha DIF, PIR e CTF simultaneamente.

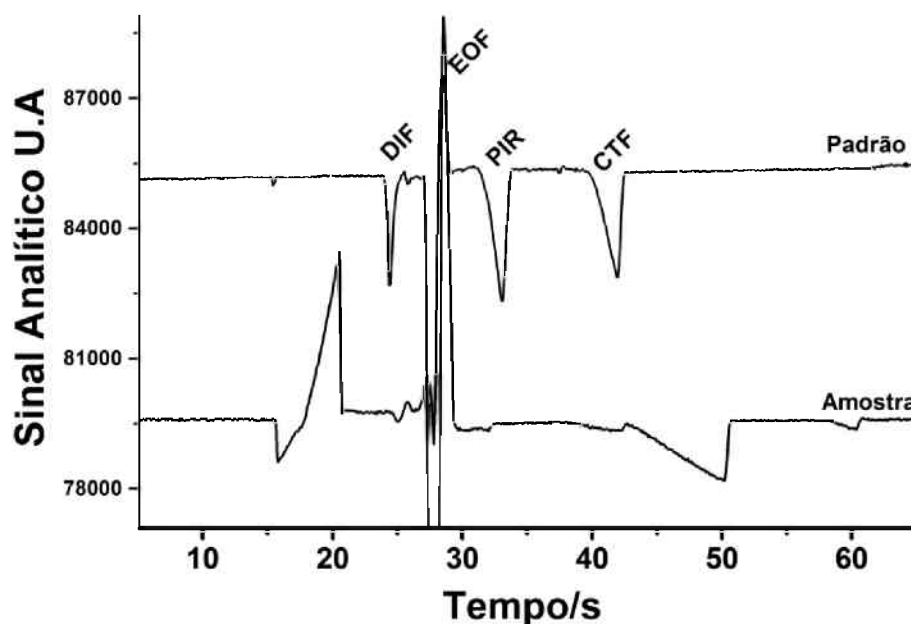


Figura 14 – Eletroferogramas de uma solução padrão e amostra de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10 mmol L^{-1} de TEA com $\text{pH} = 9,5$ ajustado com HAc ; Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Diferentemente do resultado obtido com a solução padrão, a amostra não apresentou um resultado satisfatório com o BGE utilizado. Observa-se que na solução amostra os picos de DIF e CTF não estão bem definidos e o pico da PIR nem foi detectado. Desta forma, a fim de resolver este problema, os estudos com outros BGE's foram retomados.

Segunda Etapa: Estudo de um novo BGE.

Outro BGE, que vinha sendo testado em outros trabalhos com EC no grupo de pesquisa foi utilizado para este estudo, e inicialmente apresentou resultados bastante atrativos. Diferente dos estudos iniciais, em que foram feitas uma série de otimizações com

os padrões de DIF, PIR e CTF e só nos testes finais com a amostra, nesta segunda etapa os estudos foram feitos comparando-se o comportamento do BGE com ambas as soluções (padrão e amostra), para evitar que o mesmo problema ocorresse novamente. O BGE composto por 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico ajustado com NaOH foi utilizado para um estudo inicial da variação do pH na amostra (Fig. 15A) e no padrão (Fig. 15B).

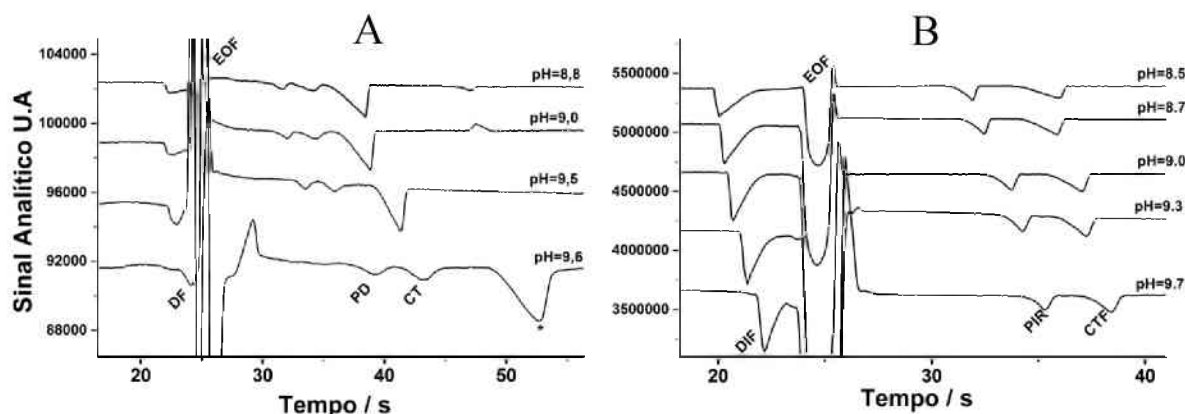


Figura 15 – Estudo do efeito do pH na análise dos padrões e amostras de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 0,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

O estudo não apresentou bons resultados para a amostra em nenhuma faixa de pH estudada no primeiro detector, já que o pico de DIF não separou do EOF, além de apresentar baixa sensibilidade e resolução entre os picos da PIR e CTF. Acredita-se que este comportamento distinto apresentado na Fig. 15 para padrão e amostra é devido aos excipientes contidos na amostra, que influenciam na migração das moléculas analisadas e interfere na separação.

Tendo como base a solução padrão de DIF, PIR e CTF, o estudo (Fig. 15B) mostrou que o pH = 9,0 foi o que apresentou os melhores resultados na separação dos compostos e por isso este pH foi selecionado para dar seguimento com os próximos estudos de otimização do BGE, para uma melhor quantificação no padrão e amostra.

Diferente do primeiro detector que não apresentou resultados satisfatórios para a amostra, o segundo detector nos mostrou resultados promissores, já que os picos apresentaram melhores resoluções, como pode ser observado na Fig. 16, onde foi analisada duas composições diferentes (10 e 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico) para o BGE composto por ácido bórico e NaOH.

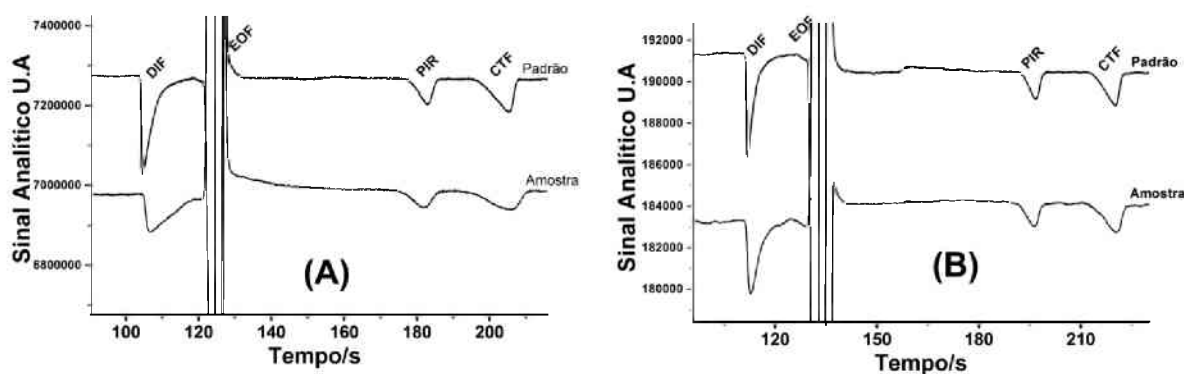


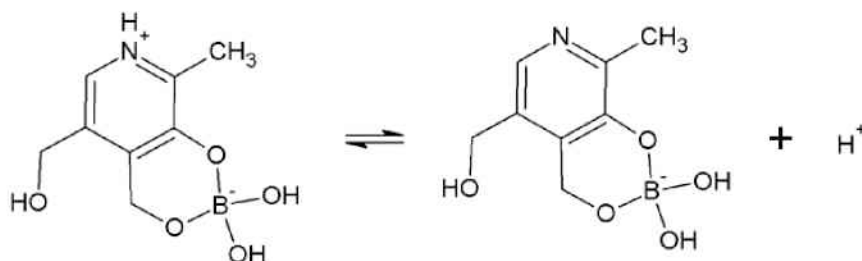
Figura 16 – Eletroferogramas de uma solução padrão e amostra de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE's: (A) 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH = 9,0 ajustado com NaOH e (B) 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH = 9,0 ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm, respectivamente; EOF: normal.

Em (A), onde foi utilizado o BGE composto por 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico + NaOH (pH = 9,0), as áreas dos picos da amostra não são compatíveis com as áreas dos picos do padrão. Já o BGE (B) composto por 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico + NaOH (pH =

9,0) apresentou valores das áreas dos picos similares para o padrão e amostra. Por isso, 20 mmol L⁻¹ foi a concentração de ácido bórico selecionada para as análises posteriores.

É possível observar no estudo de variação do pH que o tempo de migração do pico da PIR é relativamente constante (Fig. 15B). Este resultado é diferente do obtido no estudo de pH para o BGE utilizado na primeira etapa (Fig. 12) onde o pico da PIR se afasta do EOF com o aumento do pH do BGE. Segundo o equilíbrio da PIR em meio aquoso, o fenômeno observado na Fig. 12 era esperado, já que a carga líquida negativa do equilíbrio vai aumentando nesta região de pH em função da desprotonação do grupo OH da molécula (pKa = 9.4).

Provavelmente, o mesmo comportamento não ocorreu no BGE que tem na sua composição ácido bórico, devido à formação de um complexo entre o ácido e a PIR. De acordo com a literatura (BESSLER, K. E. *et al*, 2010; SCUDI, J. V., BASTEDO, W. A., WEBB, T. J, 1940), o complexo é formado, de preferência, através da combinação de duas moléculas de PIR e uma molécula de ácido bórico (2:1). No entanto, a existência do complexo na proporção de 1:1, também foi sugerida no presente trabalho, já que a concentração de PIR presente está na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração de ácido bórico (BGE) é de 20 mmol L⁻¹. Portanto, acredita-se que o complexo na proporção de 1:1 tende a ser formado. O Esquema 1 apresenta o equilíbrio ácido-base do complexo formado entre o ácido bórico e a PIR.



Esquema 1 – Equilíbrio ácido-base do complexo PIR-ácido bórico (pKa ~ 5,5).

As propriedades químicas do complexo de PIR-ácido bórico (1:1) foram acessadas por cálculos usando o site chemicalize.org. (SWAIN, M. 2012). O valor de pKa foi estimado em cerca de 5,5. Este valor indica que o complexo de PIR-ácido bórico está completamente em sua forma aniônica no intervalo de pH utilizado nos estudos da Fig. 15. Esse resultado explica o pequeno deslocamento do pico de PIR no estudo da variação do pH.

Portanto, o BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico com 25 mmol L⁻¹ de NaOH (pH = 9,0) foi selecionado nos estudos subsequentes. Vale ressaltar que, a utilização de um BGE com ácido bórico em sua composição irá conferir uma maior robustez e reprodutibilidade ao método de controle de qualidade proposto, uma vez que a mobilidade eletroforética do complexo PIR-ácido bórico permanecerá constante, mesmo com pequenas alterações no pH do BGE.

Em seguida foi feito o estudo para definição do melhor tempo de injeção (Fig. 17). Em tempos de injeção maiores tem-se uma maior área dos picos, uma vez que uma maior quantidade de analito é injetada no capilar. Elevados tempos de injeção são indesejados quando a resolução é afetada negativamente. Como observado na Fig. 17, um maior tempo de injeção proporcionou maiores áreas dos picos sem perder resolução, e por isso o tempo de 1,5 s foi selecionado.

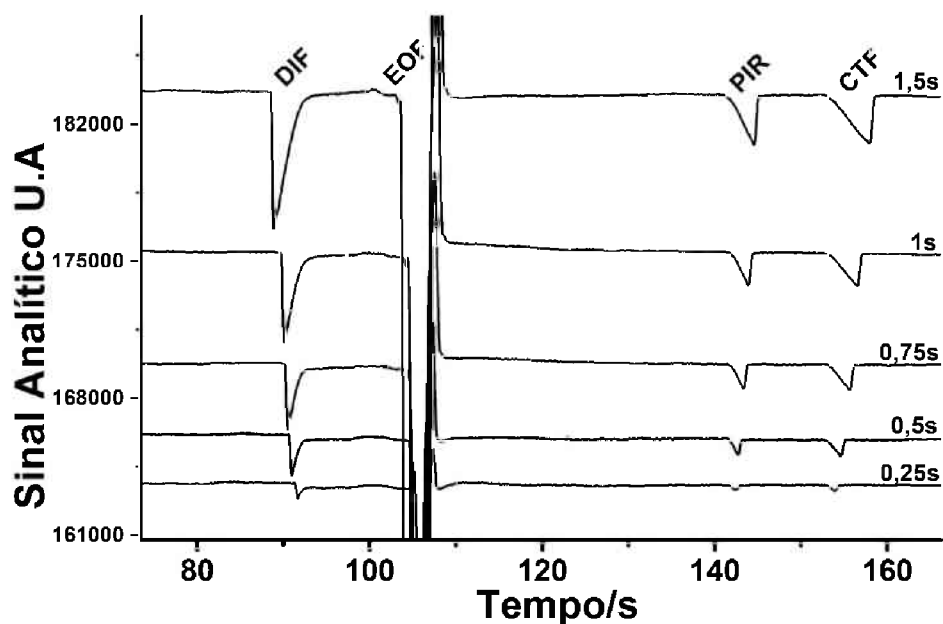


Figura 17 – Estudo do tempo de injeção utilizando uma solução padrão de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 20 mmol L^{-1} de ácido bórico + 25 mmol L^{-1} de NaOH, $\text{pH} = 9,0$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de $0,25 - 1,5 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm , respectivamente; EOF: normal.

Após a avaliação das melhores condições dos parâmetros procedeu-se com o estudo de repetibilidade para checar a estabilidade do sistema. O desempenho do sistema é mostrado na Fig. 18 com o primeiro, quinto e décimo eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo DIF, PIR e CTF. Os resultados estatísticos calculados a partir dos eletroferogramas estão apresentados na Tabela 2.

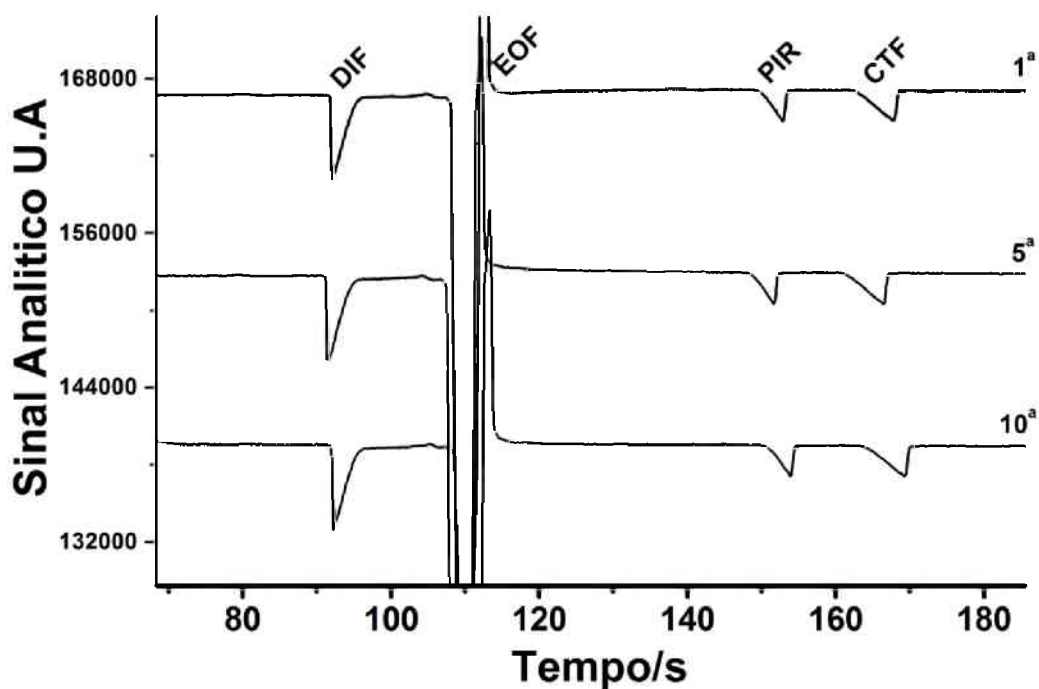


Figura 18 – Estudo da repetibilidade com dez injeções sucessivas utilizando uma solução padrão de DIF, CTF e PIR. Concentrações dos analitos: $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e CTF e $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PIR. BGE: 20 mmol L^{-1} de ácido bórico + 25 mmol L^{-1} de NaOH, $\text{pH} = 9,0$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,5 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm , respectivamente; EOF: normal.

Este estudo mostrou que o método proposto apresenta boa estabilidade, com desvios padrões relativos inferiores a $1,4$ e $0,4\%$ em relação à área e tempo de migração, respectivamente (Tabela 2). Isto mostra que não há necessidade da renovação do BGE no capilar ao longo de dez análises sucessivas (flush). Foi realizado também o estudo da repetibilidade inter-dias, onde foi feita a injeção de um padrão em três dias diferentes, o qual apresentou desvios padrão relativo inferiores a $12,4\%$ em relação à área dos picos. Este resultado indica a necessidade da calibração diária para a produção de melhores resultados.

Posteriormente foi testada a linearidade do método com os analitos em estudo, o mesmo é apresentado na Fig. 19.

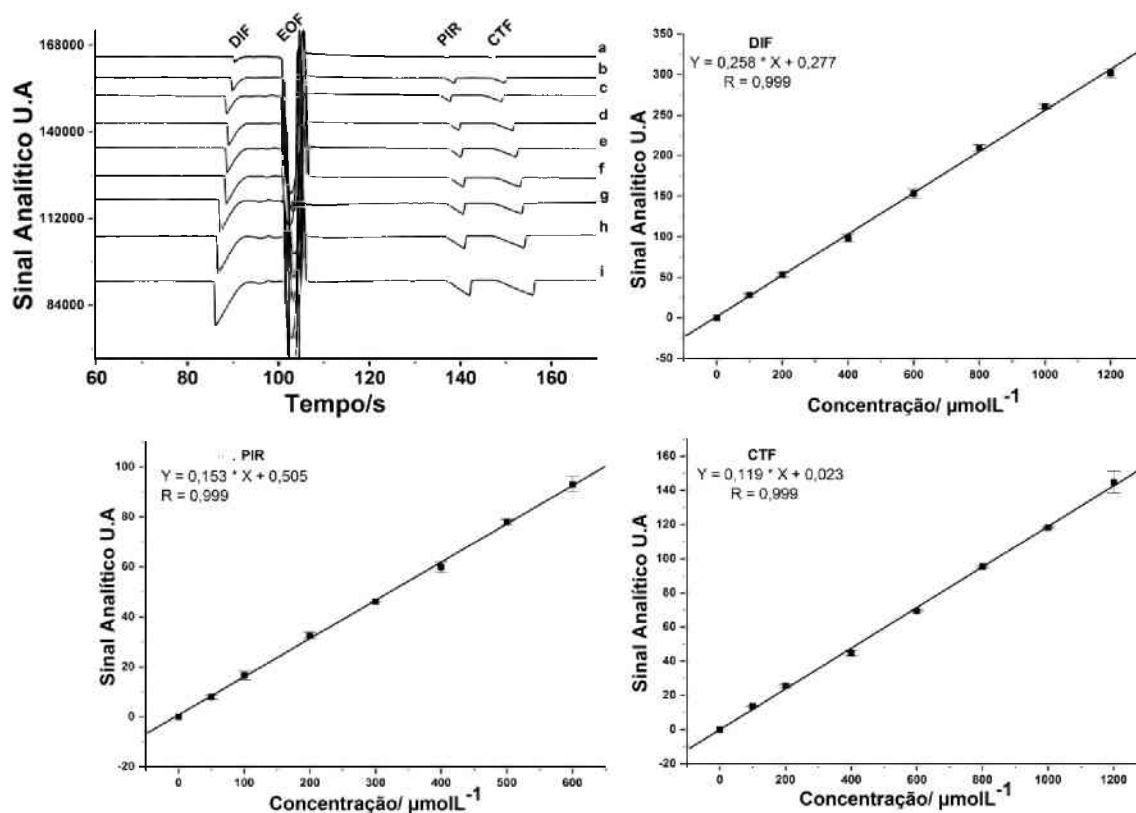


Figura 19 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão de DIF, CTF e PIR e suas respectivas curvas analíticas. Concentrações crescentes dos analitos: (a – i: 100 – 1200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de DIF e CTF e (a – i: 50 – 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de PIR. BGE: 20 mmol L^{-1} de ácido bórico + 25 mmol L^{-1} de NaOH, pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,25 – 1,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 40 e 30 cm, respectivamente; EOF: normal.

Como pode ser visualizado na Fig. 19, até mesmo em elevadas concentrações tem-se resolução e relação linear entre concentração e sinal do detector para todos os analitos estudados. Uma faixa menos ampla de concentração (a – g) foi selecionada para se

construir as curvas de calibração, as quais apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,999.

A Tabela 2 apresenta todas as características analíticas do método. Dentre estas características estão o LOD e LOQ que foram calculados de forma empírica, por apresentar resultados mais realistas. O mais comum para calcular o limite de detecção são os cálculos bem conhecidos na literatura com base na fórmula $3 S_B/b$, em que o S_B é o desvio padrão do valor da média de dez medidas do branco e b é a inclinação da curva de calibração. Para a determinação dos valores de LOD foram feitas injeções dos analitos (DIF, PIR e CTF) no equipamento, utilizando concentrações cada vez mais baixas (diluição progressiva), até que não houvesse diferença do pico do analito com o ruído de fundo. (ARMBRUSTER, D.A., TILLMAN, M. D., HUBBS, L. M. 1994) (LAWSON, G.M. 1994).

Tabela 2 – Características analíticas do método proposto.

Características	DIF	PIR	CTF
Tempo de migração (s)	91,8±0,2	152,4±0,3	168,0±0,4
Resolução ^a	3,48±0,28	8,71±0,36	2,45±0,26
Coeficiente de correlação	0,999	0,999	0,999
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	100-1200	50-600	100-1200
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,6	1,3	1,3
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,1	4,2	4, 2
Frequência analítica (h^{-1})	21	21	21
Intra-dias DPR (n = 10)	1,0%	0,6%	1,4%
Inter-dias DPR (n = 3)	2,0%	12,4%	11,4%

^a Resolução entre o pico correspondente e o anterior.

As curvas de calibração apresentadas na Fig. 19 foram usadas para avaliar a exatidão do método CE-C⁴D proposto mediante estudos de adição e recuperação para duas amostras (A1 e A2), além da comparação dos resultados obtidos na determinação de DIF, PIR e CTF por CE-C⁴D aos obtidos por HPLC (Tabela 3). Os estudos de adição e recuperação apresentaram excelentes resultados com recuperações entre 98 e 100% para todos os analitos, indicando a ausência de efeitos de matriz nas amostras.

Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de DIF, PIR e CTF via CE-C⁴D versus os obtidos por HPLC.

Amostra		Bula (mg.mL ⁻¹)	HPLC (mg.mL ⁻¹)	CE (mg.mL ⁻¹)	Erro %	
					E ₁	E ₂
A1	DIF	13,53	12,83 ± 0,03	12,74 ± 0,23	- 5,83	- 0,70
	PIR	4,13	4,17 ± 0,13	3,99 ± 0,09	- 3,50	- 4,31
	CTF	11,47	10,90 ± 0,34	10,70 ± 0,19	- 6,70	- 1,83
A2	DIF	13,53	12,42 ± 0,26	12,92 ± 0,25	- 4,50	+ 4,02
	PIR	4,13	4,12 ± 0,30	3,93 ± 0,04	- 4,77	- 4,61
	CTF	11,47	10,68 ± 0,41	10,70 ± 0,21	- 6,70	+ 0,19

E₁: Diferença entre CE-C⁴D proposto e o valor que consta na bula; E₂: Diferença entre CE-C⁴D proposto e o método de referência.

Todos os resultados obtidos por CE-C⁴D estão de acordo com os obtidos por HPLC no nível de confiança de 95%, onde os valores de t calculados (test t-Student pareado) foram menores do que o valor crítico teórico (2,40; N = 3), o que indica que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os resultados. O método de CE proposto apresentou características analíticas adequadas para a determinação simultânea de DIF, PIR e CTF, como, baixos tempos de análise e reduzida geração de resíduos devido o menor consumo de amostras e reagentes em comparação com o método de HPLC descrito anteriormente (DOGE; EGER, 2007).

4.1.1 Conclusões parciais

Esta parte do trabalho de mestrado propôs um novo, simples e rápido (21 injeções h^{-1}) método utilizando a CE- C^4D para determinação simultânea de DIF, PIR e CTF em amostras farmacêuticas. A formação de um complexo entre PIR (analito) e ácido bórico (BGE) resultou em um método menos dependente da capacidade de tamponamento do BGE (maior robustez). Além disso, o método apresentou exatidão, seletividade, exatidão, uma etapa simples de preparação da amostra (apenas diluição) e geração mínima de resíduos por análise.

4.2 Determinação simultânea de NAF e Zn.

De acordo com os dados obtidos na literatura (SWAIN, 2012), a NAF é uma base fraca com pK_a igual a 10,2 e, portanto, predominantemente na forma catiônica em soluções aquosas com $pH < 12$, Fig. 20. O zinco em solução aquosa também está na forma catiônica (Zn^{2+}), porém sabe-se que em soluções com um pH mais elevado (> 7), a concentração de Zn^{2+} livre é reduzida, pois, nestas condições a concentração do cátion bivalente diminui com o aumento do pH, devido a formação de $Zn(OH)^+$, $Zn(OH)_{2(s)}$, $Zn(OH)_3$ e $Zn(OH)_4^{2-}$. A precipitação do $Zn(OH)_{2(s)}$ é observado em pH's acima de 8,0, o qual torna-se inadequado para a separação por CE. Por isso, é necessário trabalhar com um BGE que possua um $pH < 7$, já que nesta condição o Zn estará presente na forma iônica (Zn^{2+}), assim como a NAF estará 100% protonada.

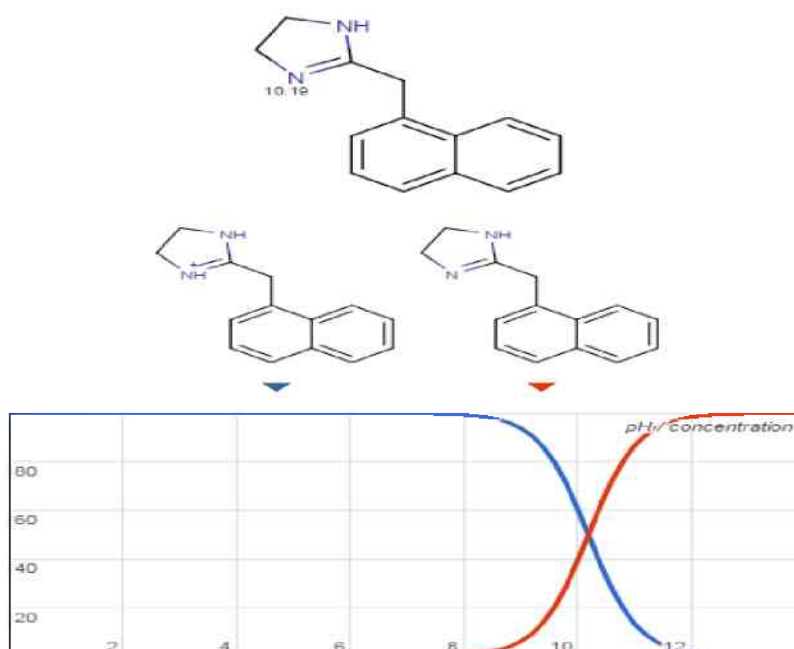


Figura 20 - Curva da relação de carga versus pH da molécula de NAF. (SWAIN, 2012).

Conforme descrito na literatura (de CARVALHO et al, 2009; LOPES; COELHO; GUTZ, 2011; LOPES; JUNIOR; GUTZ, 2010), a determinação de Zn pode ser realizada por CE utilizando um BGE composto por concentração equimolar de MES e HIS (pH = 6,0) na presença de 5 % (v/v) de metanol. Segundo os autores, a presença de metanol no BGE serve para melhorar a resolução dos sinais no eletroferograma. Nestes trabalhos citados no parágrafo anterior, o Zn é determinado com tempo de migração superior a seis minutos.

Neste BGE (MES/HIS pH= 6,0), o zinco complexa com a molécula de HIS (através dos anéis de imidazol) formando espécies catiônicas $\text{Zn}-(\text{HIS})_2^+$ (SHENG-LI et al, 2002) (RICHARD et al, 2000). Simulações realizadas utilizando software Peakmaster® (JAROS; et al, 2004) revelou que os picos de sódio e zinco são muito próximos, desta forma, a formação do complexo reduz a mobilidade do zinco e aumenta a sua resolução com relação ao pico do sódio.

Tendo como ponto de partida os trabalhos já citados, e também como prática comum o uso de um BGE que possua um contra-íon com baixa mobilidade (MES/HIS), para evitar o aumento da temperatura (consequente aumento do ruído do detector), diferentes concentrações de MES e HIS (10, 20 e 30 mmol L⁻¹) foram testadas com e sem a adição de metanol. O BGE composto de 20 mmol L⁻¹ de MES e HIS sem adição de metanol (pH = 6,1) mostrou os melhores resultados (estabilidade, resolução, velocidade de análise) na determinação simultânea de NAF e Zn, como mostra a Fig. 21. Os testes com adição de metanol na composição do BGE não apresentaram nenhuma diferença no desempenho do mesmo na determinação dessas duas moléculas, por isso optou-se por não utilizá-lo, já que o metanol é tóxico tanto para o analista quanto para o meio ambiente.

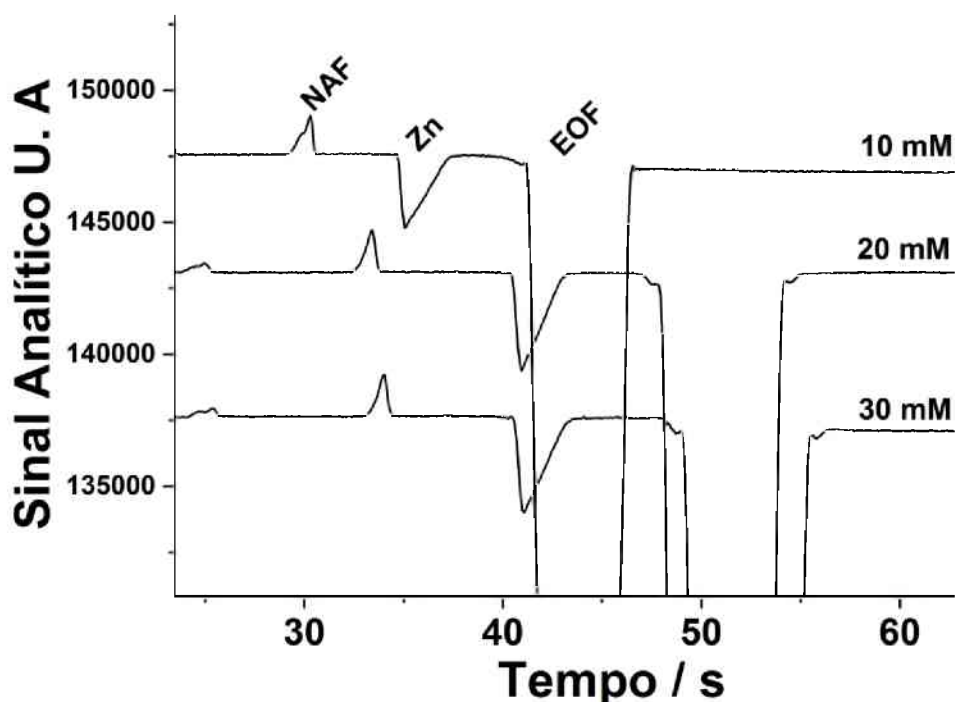


Figura 21 – Estudo da composição do BGE utilizando uma solução padrão de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $930 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE's: 10, 20 e 30 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,5 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 13 cm, respectivamente; EOF: normal.

Como já era esperado, um aumento na concentração do BGE acarreta em um aumento no tempo de análise, já que a velocidade maior para o EOF do BGE de menor concentração é atribuída ao fato de que, o aumento da força iônica ocasiona uma compressão da dupla camada elétrica, diminuindo a magnitude do EOF. Porém, além de um menor tempo de análise, devem-se levar em consideração outros parâmetros, como, por exemplo, uma melhor definição e maiores áreas para os picos, parâmetros esses que levaram à escolha do BGE composto por 20 mmol L^{-1} de MES/HIS, que será utilizado nos próximos estudos.

Em seguida foi feito o estudo para definição do melhor tempo de injeção. No intervalo de 0,75 a 2,0 (Fig. 22), o tempo de injeção intermediário de 1 s foi selecionado para as análises posteriores, pois apresentou maiores áreas para todos os picos.

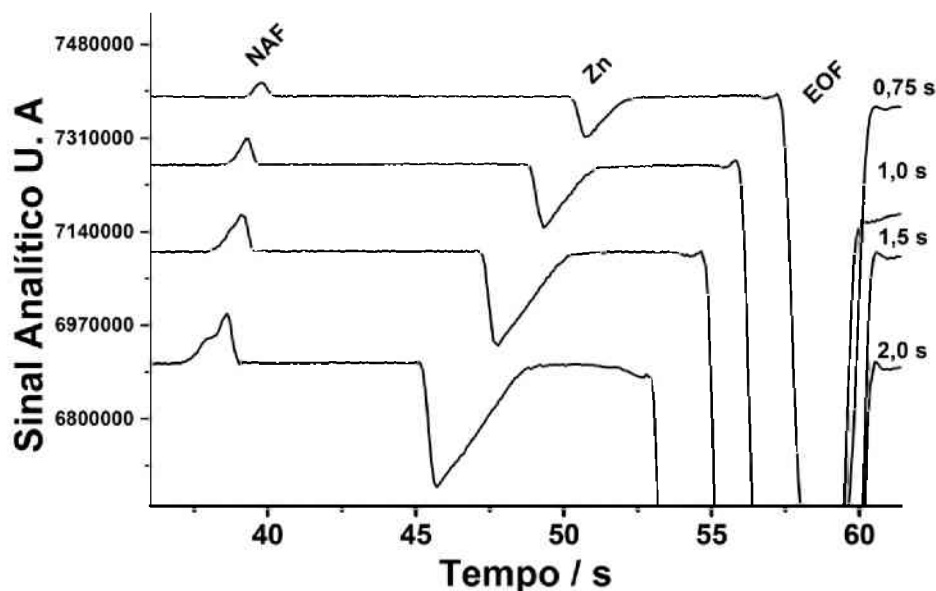


Figura 22 – Estudo do tempo de injeção de uma solução padrão de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $930 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de $0,75 - 2,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente; EOF: normal.

Os estudos de repetibilidade intra-dia e inter-dias foram feitos para testar a estabilidade do sistema. Na Fig. 23 estão apresentados os eletroferogramas do estudo intra-dias, onde foram feitas dez injeções sucessivas de uma solução padrão, o qual apresentou um $\text{DPR} < 2\%$. No estudo inter-dias foram feitas injeções da solução padrão em três dias distintos, e os valores de DPR foram menores que $5,5\%$, isto significa que o método possui elevada estabilidade mesmo em dias distintos.

Desta forma, existe a possibilidade do analista optar por fazer ou não a calibração diária do método proposto. Vale ressaltar que, os desvios do teste intra-dias são menores que do teste inter-dias e a calibração diária seria mais indicada quando houver a necessidade de uma maior exatidão dos resultados.

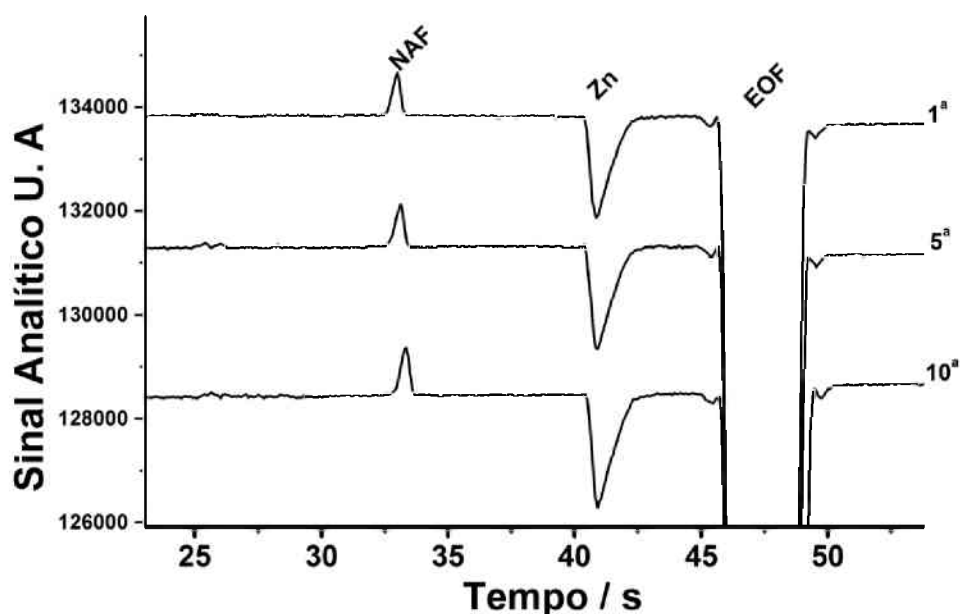


Figura 23 – Estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de uma solução padrão de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $930 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente; EOF: normal.

Para avaliar a faixa linear de resposta do método foram feitas injeções de concentrações crescentes com padrões contendo NAF e Zn (Fig. 24), onde as concentrações utilizadas na construção das curvas de calibração levaram em conta a proporção encontrada em amostras farmacêuticas comerciais, que neste caso é

aproximadamente 3 Zn : 1 NAF. As curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,997 e 0,999 para NAF e Zn, respectivamente.

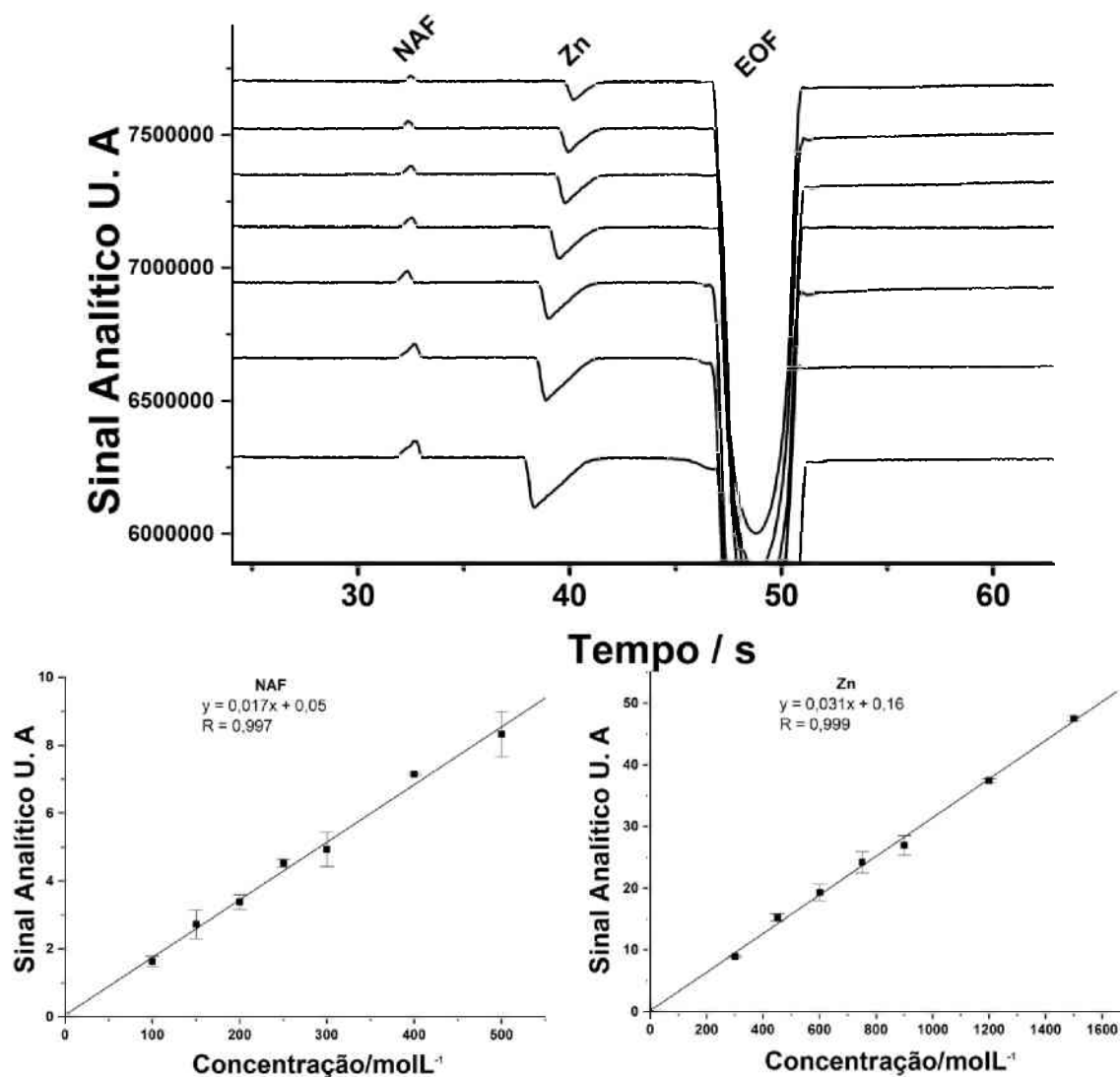


Figura 24 – Eletroferogramas obtidos a partir de soluções padrão de NAF e Zn e suas respectivas curvas de calibração. Concentrações crescentes dos analitos: NAF (100 - 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Zn (300 - 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um pH = 6,1. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 ± 2 cm, respectivamente; EOF: normal.

A Tabela 4 apresenta de forma resumida todas as características analíticas do método. As curvas de calibração foram utilizadas para posterior análise de duas amostras farmacêuticas que continham NAF e Zn em sua formulação.

Tabela 4 – Características analíticas do método proposto.

Características	NAF	Zn
Tempo de migração (s)	32,4±0,3	40,2±0,5
Resolução	5,65±0,11	3,49±0,14
Coefficiente de correlação	0,997	0,999
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	100-500	300-1500
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	20	30
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	67	100
Frequência analítica (h^{-1})	90	90
DPR Intra-dia (n = 10)	2,0%	1,2%
DPR Inter-dias (n = 3)	4,7%	5,5%

O LOD foi calculado da mesma forma que no estudo anterior (4.1). Embora os valores de LOD apresentados na Tabela 4 sejam relativamente elevados, eles são adequados para a análise das formulações farmacêuticas estudadas neste trabalho.

Na Fig. 25 estão apresentados os eletroferogramas de uma solução padrão (a) e de uma solução amostra (b). Observa-se que o BGE otimizado fornece ao sistema CE-C⁴D uma linha de base estável para ambas as soluções (padrão e amostra), apesar da elevada concentração de sódio presente na amostra. O método proposto mostrou-se adequado para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo NAF e Zn, pois não houve sobreposições ou picos adicionais provenientes de interferentes (excipientes, por exemplo).

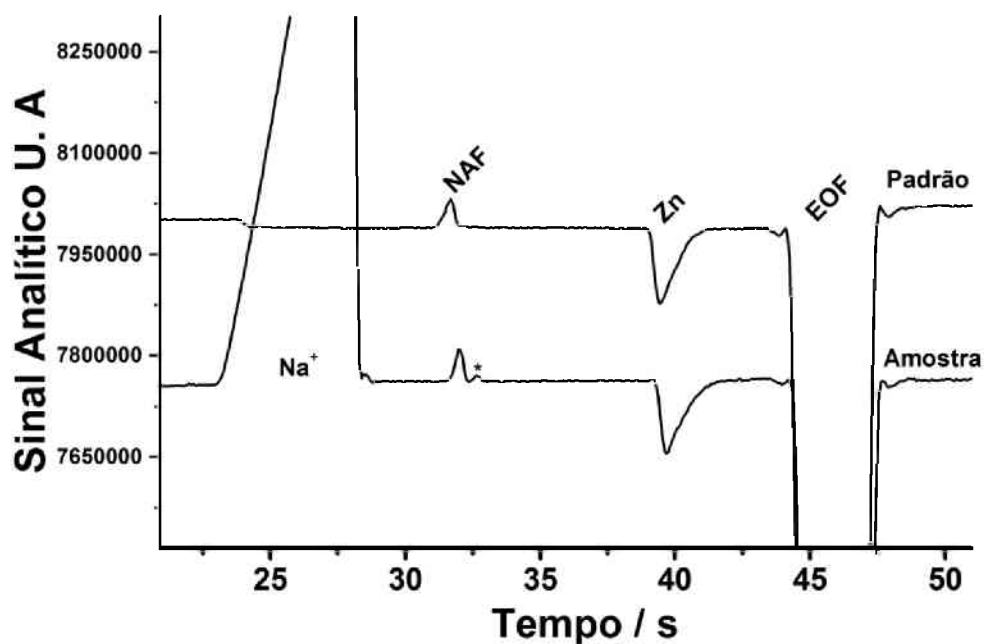


Figura 25 – Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão (a) e amostra (b) de NAF e Zn. Concentrações dos analitos: $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e $900 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. BGE: 20 mmol L^{-1} de MES/HIS em iguais proporções para um $\text{pH} = 6,1$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e $10 \pm 2 \text{ cm}$, respectivamente; EOF: normal.

A exatidão do método CE- C^4D proposto foi avaliada através da análise de duas amostras farmacêuticas (A1 e A2). A Tabela 5 apresenta uma comparação dos resultados obtidos com o método proposto e os obtidos por HPLC (NAF) e FAAS (Zn).

Tabela 5 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de NAF e Zn via CE-C⁴D e por HPLC e FAAS.

Amostra		Bula (mg mL ⁻¹)	CE (m g mL ⁻¹)	FAAS (mg mL ⁻¹)	HPLC (mg mL ⁻¹)	Erro %	
						E ₁	E ₂
A1	NAF	0,150	0,150±0,007	-	0,154 ± 0,008	0	-2,59
	Zn	0,122	0,120±0,013	0,120±0,001	-	-1,33	0
A2	NAF	0,150	0,146±0,015	-	0,144 ± 0,001	-2,66	+1,37
	Zn	0,122	0,120±0,017	0,126±0,002	-	-1,64	-4,76

E₁: Diferença entre CE-C⁴D proposto e o valor que consta na bula; E₂: Diferença entre CE-C⁴D proposto e o método de referência.

Todos os resultados obtidos pelo método proposto (CE-C⁴D) são similares aos obtidos por HPLC e FAAS. A um nível de confiança de 95%, os valores de t calculados (teste *t-Student* pareado) foram menores do que o valor crítico teórico (2,40, n = 3), o que indica que não há diferenças significativas entre os resultados.

A exatidão do método também foi determinada por testes de adição e recuperação. Os resultados foram iguais a 97% ± 1 e 102% ± 2 (n=3) de recuperação para NAF e Zn, respectivamente, indicando a boa exatidão do método desenvolvido.

4.2.1 Conclusões parciais

Foi proposto um método novo, simples e rápido (90 injeções h⁻¹) utilizando a CE-C⁴D para a determinação simultânea de NAF e Zn em amostras farmacêuticas. O método demonstrou exatidão e seletividade, podendo ser utilizado como um único método em substituição de dois métodos já descritos na literatura (HPLC e FAAS) para o controle de qualidade de amostras farmacêuticas que contém os dois compostos simultaneamente. O método proposto além de ser rápido consome uma pequena quantidade de solventes/reagentes e, conseqüentemente, resulta em menor impacto ambiental (produção

de volume mínimo de resíduos por análise). Além disso, a etapa de preparação da amostra é simples e rápida (apenas diluição em água).

4.3 Determinação simultânea de NAF + DIF; NAF + FEN; NAF + CFEN.

As moléculas estudadas nesta parte do trabalho são bases fracas. A NAF possui $pK_a = 10,2$ (Fig. 20) a DIF $pK_a = 8,9$ e ambas as moléculas, FEN e CFEN, possuem os mesmos pK_a s ($pK_{a1} = 3,6$ e $pK_{a2} = 9,5$) (Fig. 26). Com estas informações conclui-se que estas moléculas estarão em forma de cátions em soluções aquosas com pH inferior a 10 e, portanto, podem ser determinadas por CZE (SWAIN, 2012).

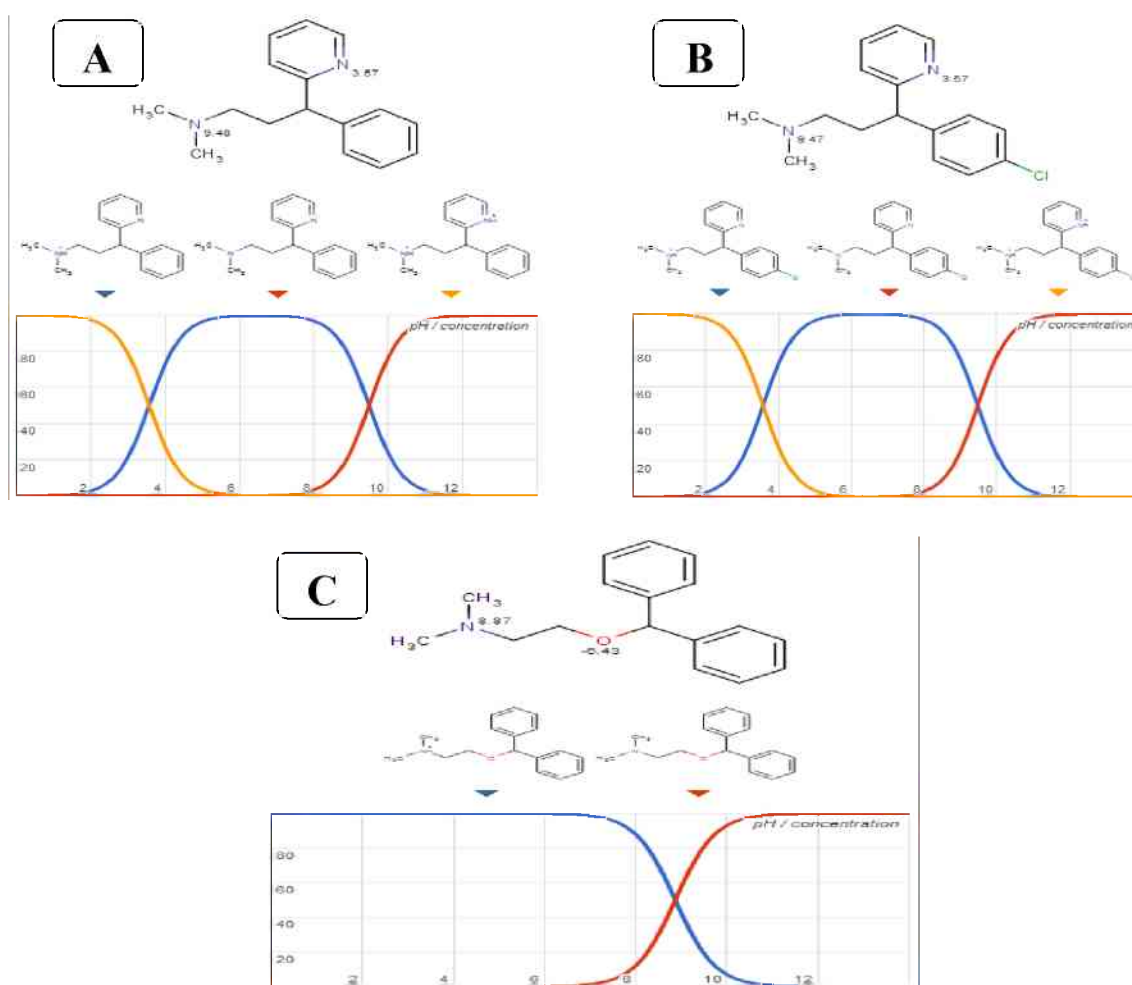


Figura 26 - Curva da relação de carga versus pH da molécula de (A) FEN, (B) CFEN e (C) DIF. (SWAIN, 2012).

Inicialmente, uma variedade de BGE's de composições e pHs diferentes, comumente utilizados em CE-C⁴D pelo nosso grupo de pesquisa, foram avaliados na tentativa de separar os quatro compostos em estudo em uma única corrida. Ou seja, as três amostras existentes no mercado (1: NAF +DIF; 2: NAF + FEN; 3: NAF + CFEN) poderiam ser analisadas empregando um único procedimento de calibração. Após inúmeras tentativas, a separação das quatro espécies não foi possível em nenhum BGE avaliado.

Em seguida, as três combinações das formulações farmacêuticas (1: NAF +DIF; 2: NAF + FEN; 3: NAF + CFEN) foram divididas em dois grupos: GRUPO 1: NAF e DIF; GRUPO 2: NAF, FEN e CFEN. Na Figura 27 são apresentados os resultados obtidos com o BGE composto por 10 mmol L⁻¹ de TEA + OXA até pH = 8,5.

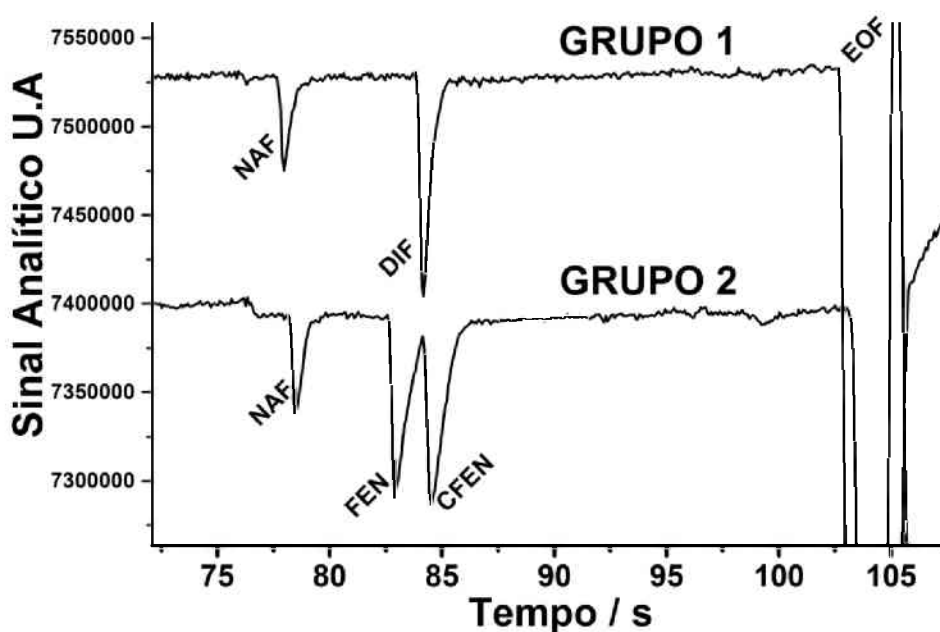


Figura 27 – Eletroferogramas obtidos com a injeção de duas soluções padrão contendo NAF e DIF (Grupo 1) e NAF, FEN e CFEN (Grupo 2). Concentração de todos os analitos: 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. BGE: 10 mmol L⁻¹ de TEA + OXA até pH=8,5. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 40 cm, respectivamente; EOF: normal.

Como pode ser observado na Fig. 27, a DIF, FEN e CFEN possuem mobilidades similares e a separação das três moléculas não seria possível se presentes na mesma solução. Resultados similares foram obtidos com os demais BGEs estudados (20 mmol L⁻¹ de MES/HIS pH=6,0; 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico + NaOH pH= 8,6 – 9,6; 20 mmol L⁻¹ de MES + 10 mmol L⁻¹KOH pH= 6; 20 mmol L⁻¹ de CHES + NaOH e 20 mmol L⁻¹ de CHES + KOH pH= 8,5 – 9,5). A separação entre FEN e CFEN é possível ($r = 1,1$) quando as moléculas se encontram em concentrações similares, o que não ocorre nas amostras comerciais (concentração de FEN 10 vezes superior a CFEN).

Em função das limitações existentes para a determinação das quatro moléculas em uma ou duas corridas, os estudos foram direcionados na busca por um BGE de composição única para a análise das três combinações farmacêuticas existentes no mercado (1: NAF + DIF; 2: NAF + FEN; 3: NAF + CFEN).

Outro problema identificado em relação a composição de amostras foi a elevada concentração de NaCl adicionada na formulação usada como solução nasal (NAF + DIF), visto que o detector utilizado é condutométrico. Dependendo da mobilidade do BGE utilizado, o sódio pode apresentar um pico de grande magnitude, pois possui elevada condutividade, o que poderia causar uma interferência nos picos dos analitos de interesse.

Desta forma, os estudos de identificação do BGE a ser usado foram realizados empregando uma amostra oftalmológica (NAF + FEN) e uma amostra da solução nasal (NAF + DIF). Na continuidade dos estudos, o desempenho do BGE utilizado na determinação de NAF e Zn (20 mmol L⁻¹ de MES/HIS) foi avaliado para este fim (Fig. 28).

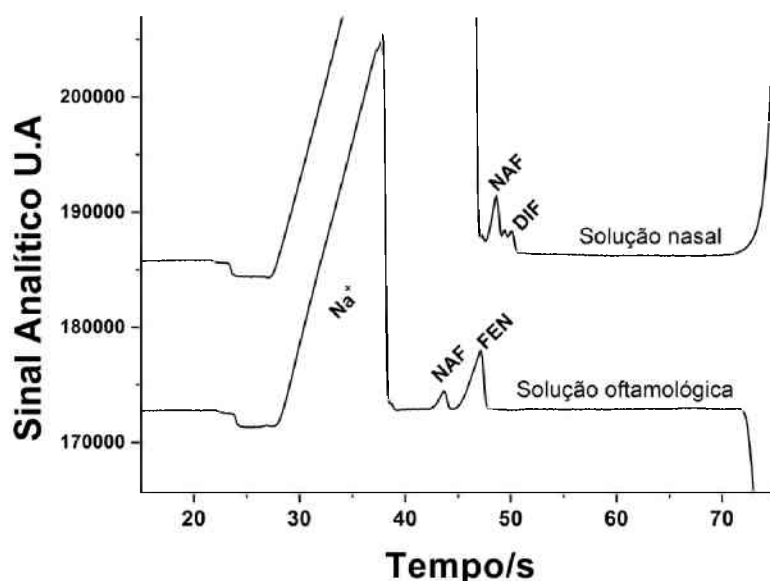


Figura 28 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de duas soluções amostra contendo NAF + DIF (solução nasal) ou NAF + FEN (solução oftalmológica) diluídas em água (duas vezes). BGE: 20 mmol L⁻¹ de MES e HIS (pH=6,1). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Como mostra a Fig. 28, além dos princípios ativos NAF + FEN (solução oftalmológica) e NAF + DIF (solução nasal), ambas as amostras contêm sódio como excipiente. Na amostra oftalmológica, obteve-se uma resolução adequada ($r = 1,7$) entre o excipiente (Na) e os analitos (NAF e FEN). No entanto, a concentração de Na na amostra nasal é muito maior, e por isso, o eletroferograma não apresentou uma resolução adequada entre os picos de Na e os princípios ativos (NAF e DIF).

A fim de obter uma melhor resolução entre as espécies em estudo nas respectivas amostras, BGE's com diferentes composições foram avaliados. A estratégia adotada neste estudo foi deixar o BGE com mobilidade similar a do Na presente na amostra, através da adição de NaOH à soluções contendo ácidos fracos até pHs próximos a seus respectivos pKas (boa capacidade tamponante). Deste modo, a presença de sódio deverá deixar de ser

detectada pelo detector C^4D . Alguns ácidos fracos comumente usados na composição de BGEs em CZE (JAROS et al, 2004) foram selecionadas. Como mostrado na Fig. 29, as seguintes soluções foram testadas como BGEs: (A) 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico (pH = 9,5); (B) 20 mmol L⁻¹ de MES (pH = 6,0); (C) 50 mmol L⁻¹ de CHES (pH = 8,5); (D) 20 mmol L⁻¹ de CHES (pH = 8,5); (E) 12 mmol L⁻¹ TEA + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 8,5); (F) 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 9,8). Em todas as soluções, o pH foi ajustado mediante adição de NaOH. Para cada BGE citado acima (A – F) foi feito um estudo da variação do pH, utilizando uma solução padrão. Neste estudo foi selecionado o melhor pH para cada BGE.

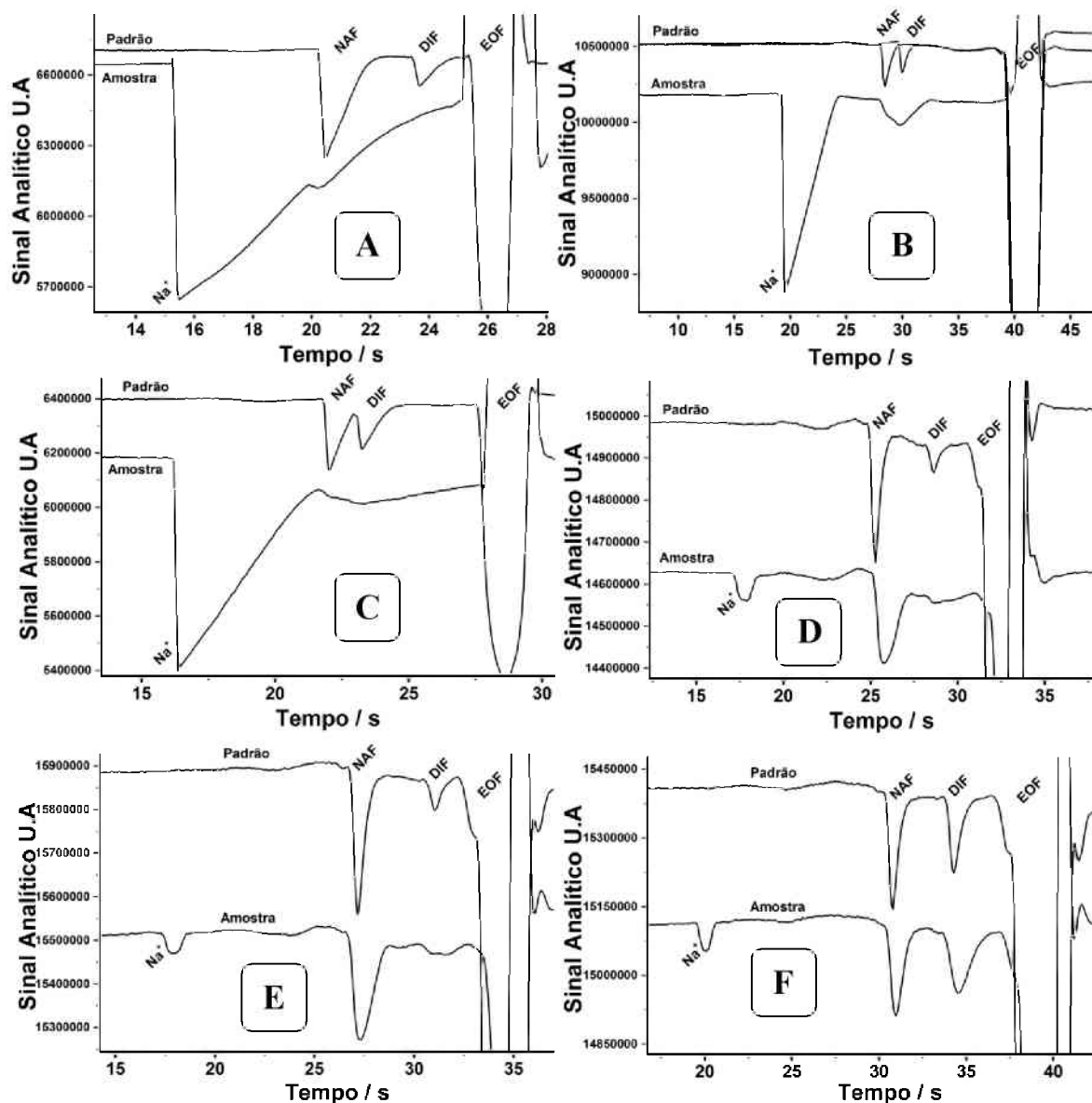


Figura 29 – Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão e amostra contendo NAF + DIF. BGE's (pH ajustado com NaOH): (A) 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico (pH = 9,5); (B) 20 mmol L⁻¹ de MES (pH = 6,1); (C) 20 mmol L⁻¹ de CHES (pH = 8,5); (D) 50 mmol L⁻¹ de CHES (pH = 8,5); (E) 12 mmol L⁻¹ TEA + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 8,5); (F) 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ de DMX (pH = 9,8). Concentração: 250 μ mol L⁻¹ de DIF e 500 μ mol L⁻¹ de NAF. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

O melhor desempenho foi observado com o BGE composto por HIS e DMX com pH ajustado a 9,8 com NaOH (F), pois além do eletroferograma não apresentar interferência do pico do sódio, uma boa sensibilidade e resolução entre os picos foi obtida.

Em substituição ao DMX, presente no BGE (F) selecionado, o HCl foi avaliado, já que este ácido é mais comum e de menor custo que o DMX. Contudo, como mostrado na Fig. 30, a substituição do DMX por HCl não gerou resultados satisfatórios para a amostra, já que a resolução entre a NAF e DIF diminuiu em função do alargamento dos picos dos compostos em estudo na solução amostra.

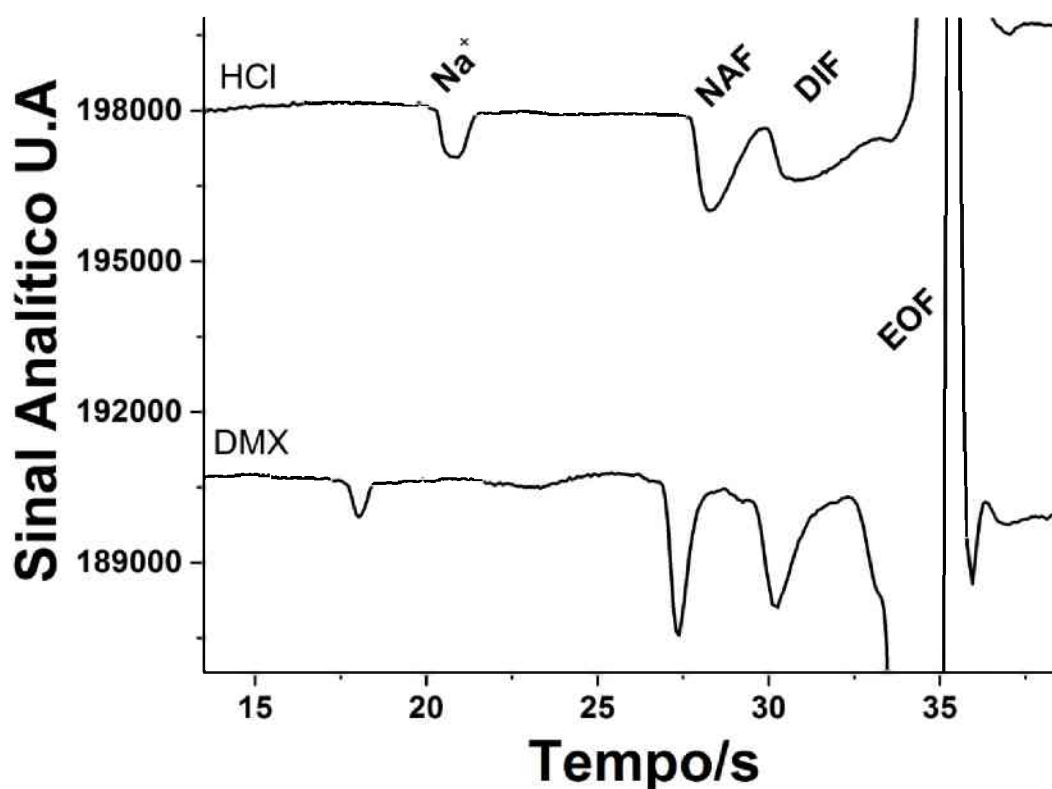


Figura 30 – Eletroferogramas obtidos pela injeção de soluções padrão contendo de NAF e DIF. Concentração dos analitos: $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF. BGE's: (1) 20 mmol L^{-1} de HIS + 10 mmol L^{-1} DMX + NaOH (pH = 9,8) e (2) 20 mmol L^{-1} de HIS + 10 mmol L^{-1} HCl + NaOH (pH = 9,8). Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Desta forma, o BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de HIS + 10 mmol L⁻¹ DMX e NaOH (pH = 9,8) foi utilizado nas demais análises. Posteriormente, estudos foram realizados para avaliar alguns parâmetros relacionados com o equipamento de CE-C⁴D: tempo de injeção, potencial de separação, temperatura e comprimento efetivo do capilar.

A Fig. 31 apresenta os eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção usando soluções padrões contendo combinações e concentrações similares as existentes em amostras comerciais (NAF + DIF, NAF + FEN e NAF + CFEN).

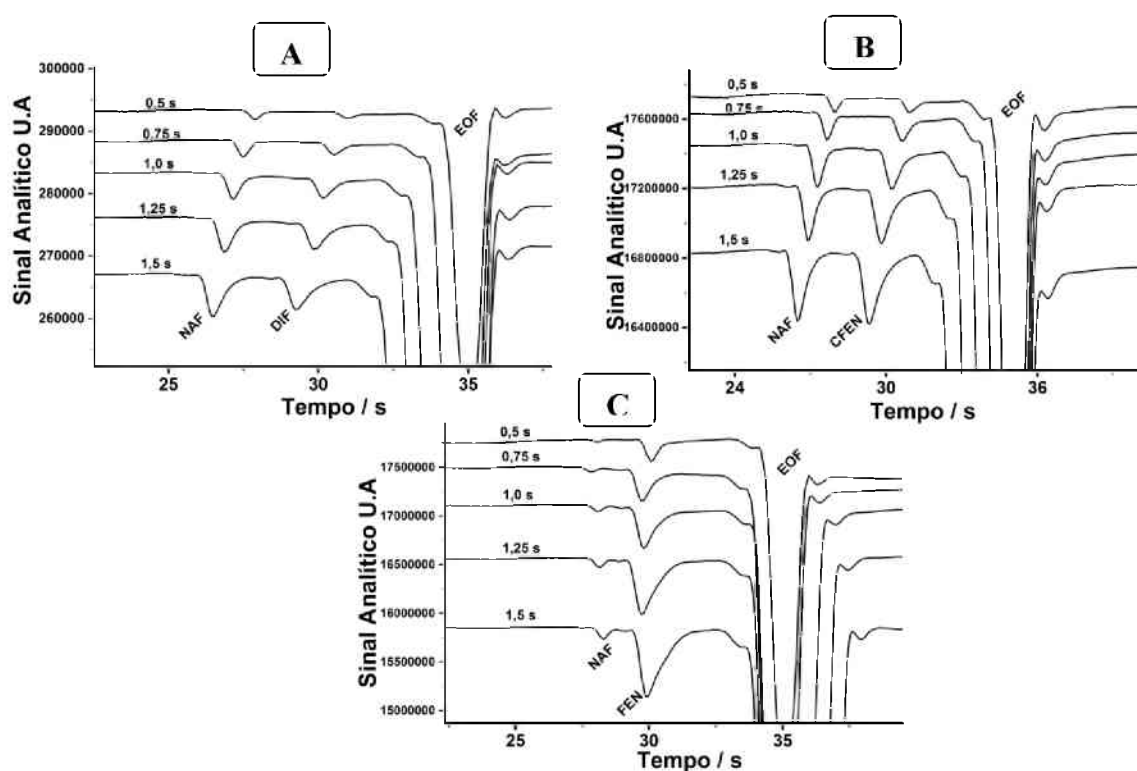


Figura 31 – Estudo do tempo de injeção utilizando soluções padrões contendo: (A) NAF + DIF (500 + 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) NAF + FEN (100 e 840 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (C) NAF + CFEN (500 e 312,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. BGE: 20 mmol L⁻¹ de HIS com 10 mmol L⁻¹ DMX e 1 mmol L⁻¹ de NaOH (pH = 9,8); Pressão de injeção: 25 kPa; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

O tempo de injeção de 1,25 segundos foi utilizado nas demais análises, pois apresentou uma maior área dos picos para todas as espécies, sem perder resolução entre os respectivos picos. Um resumo dos parâmetros estudados e respectivos valores com as melhores condições é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Relação dos parâmetros com as melhores condições.

Parâmetros	Intervalo estudado	Melhor condição
pH do BGE	9,0 – 10,2	9,8
Comprimento efetivo do capilar (cm)	10 e 40 cm	10 cm
Potencial de separação (kV)	15 – 25 kV	25 kV
Tempo de injeção (s) à 25 kPa	0,5 – 1,5 s	1,25 s
Temperatura (°C)	20 – 30° C	25° C

Na Fig. 32 são apresentados os eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade intra-dias, onde foram feitas dez injeções sucessivas de soluções padrões contendo combinações e concentrações similares as existentes em amostras comerciais. Os seguintes desvios (área) foram obtidos: DPR < 3,5% para NAF e DIF, DPR < 3,2% para NAF e FEN e DPR < 2,4% para NAF e CFEN.

No estudo inter-dias foram avaliados os resultados obtidos com as mesmas soluções em três dias distintos. Neste estudo, os valores de DPR (área) foram menores que 7,8%, 6,8% e 4,7% para as combinações de NAF + DIF, NAF + FEN e NAF + CFEN, respectivamente. Os valores de DPR para os testes inter-dias demonstram uma boa estabilidade do sistema mesmo em dias distintos, porém, a construção diária da curva de calibração é indicada para obtenção de maior exatidão dos resultados.

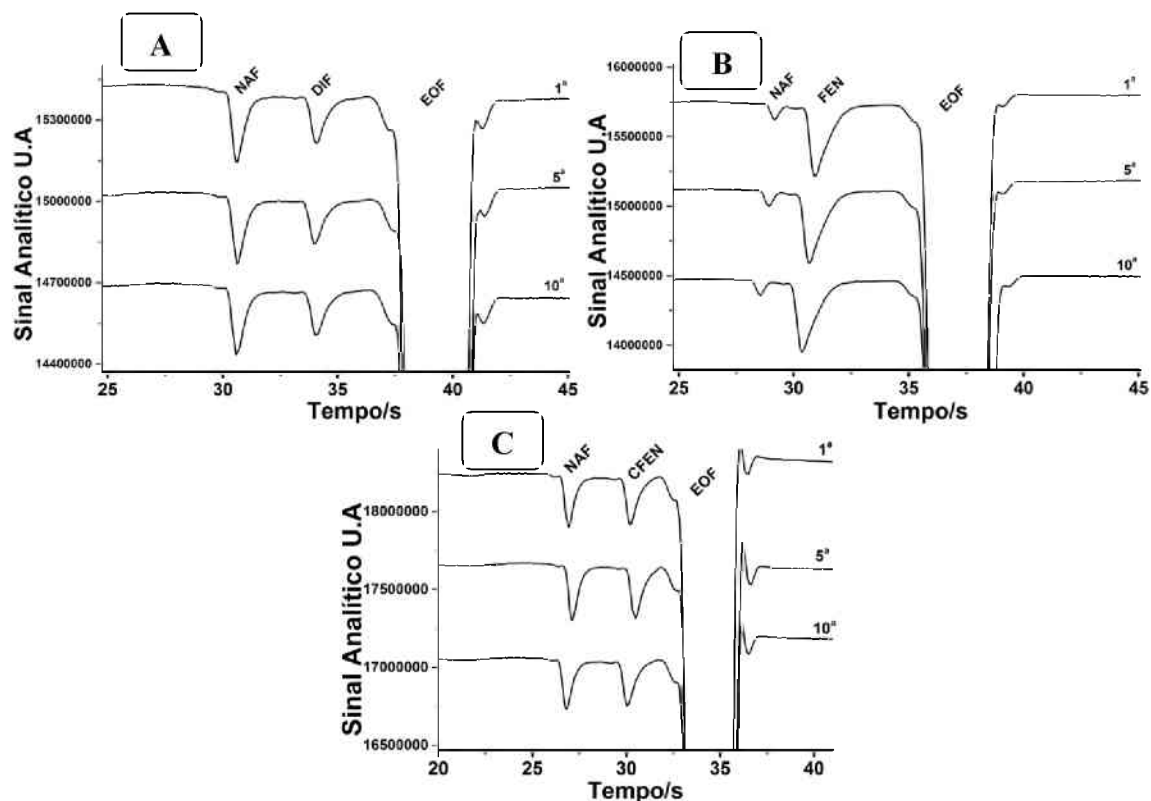


Figura 32 – Estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por NAF +DIF (500 e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$), NAF + FEN (100 e $840 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF + CFEN (500 e $312,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS com 10 mmol L^{-1} DMX + 1 mmol L^{-1} NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,25 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.

Após a realização dos estudos para selecionar os melhores parâmetros instrumentais do método, um teste para avaliação da faixa linear de resposta foi realizado. Soluções contendo concentrações crescentes e em proporções similares as existentes em amostras comerciais foram avaliadas neste estudo (NAF + DIF; NAF + FEN; NAF + CFEN). Os eletroferogramas e as curvas de calibração obtidos neste estudo são apresentados na Fig. 33.

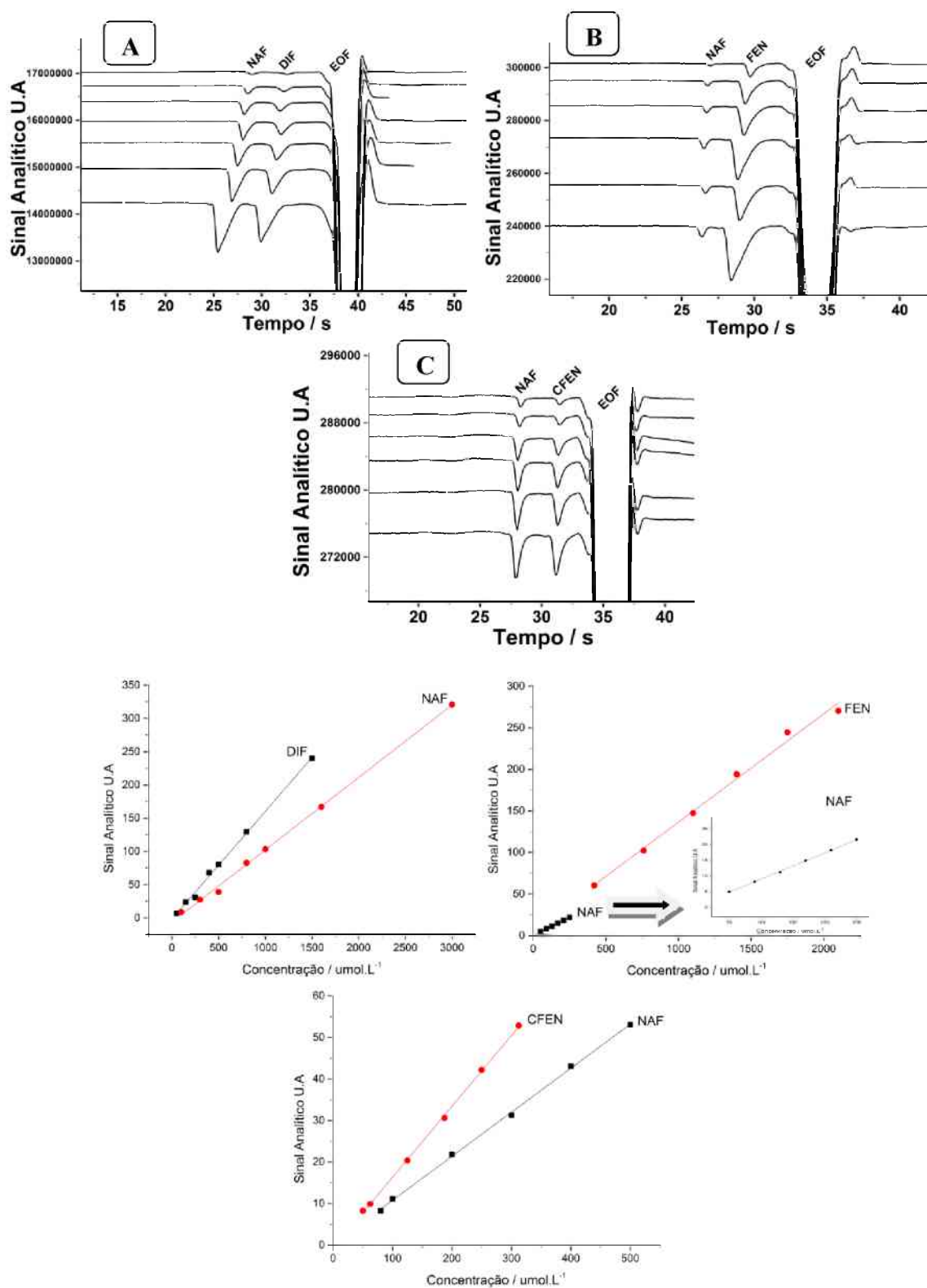


Figura 33 – Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de NAF + DIF, NAF + FEN e NAF + CFEN e suas respectivas curvas de calibração. Concentrações: (A) DIF ($50 - 800 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($100 - 1600 \mu\text{mol L}^{-1}$), de (B) FEN ($420 - 1750 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF ($50 - 210 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (C) CFEN ($50 - 322 \mu\text{mol L}^{-1}$) e NAF

(80 - 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS com 10 mmol L^{-1} DMX e 1 mmol L^{-1} de NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,25 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Como mostra a Figura 33, em toda faixa de concentração examinada tem-se resolução adequada ($r > 1,4$) e relação linear entre concentração e condutividade para todos os analitos estudados. As características analíticas do método são resumidamente apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Características analíticas do método proposto.

Características analíticas	NAF DIF	NAF FEN	NAF CFEN
Tempo de migração (s)	32,4 ± 0,2	29,3 ± 1,2	29,9 ± 1,2
	34,2 ± 0,1	31,1 ± 1,1	30,3 ± 1,1
Resolução	2,25 ± 0,11	1,4 ± 0,05	2,1 ± 0,08
	1,83 ± 0,08	2,3 ± 0,09	1,6 ± 0,07
Coeficiente de correlação	0,999	0,998	0,999
	0,999	0,997	0,999
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	100-1600	90-250	80-500
	50-800	760-2100	50-312,5
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	25	25	25
	25	25	13
LOQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	83	83	83
	83	83	43
Frequência analítica (h^{-1})	113	113	113
DPR intra-dias (n = 10)	3,5%	3,2%	2,4%
	2,3%	2,2%	1,5%
DPR inter-dias (n = 3)	4,3%	2,2%	3,0%
	7,8%	6,8%	4,7%

As curvas de calibração construídas a partir dos intervalos de concentrações apresentados na Fig. 33 apresentaram bons coeficientes de correlação ($> 0,997$). Os LOD's do método também foram calculados e são apresentados na Tabela 7.

Utilizando as curvas de calibração da Fig. 33, duas amostras (A1 e A2) de cada formulação farmacêutica (1 NAF + DIF; 2 NAF + FEN; 3 NAF + CFEN) foram analisadas. A Fig. 34 apresenta os eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões e amostras com composições similares. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos

por CE-C⁴D comparados aos disponibilizados na bula e aos obtidos com o método de referencia (HPLC).

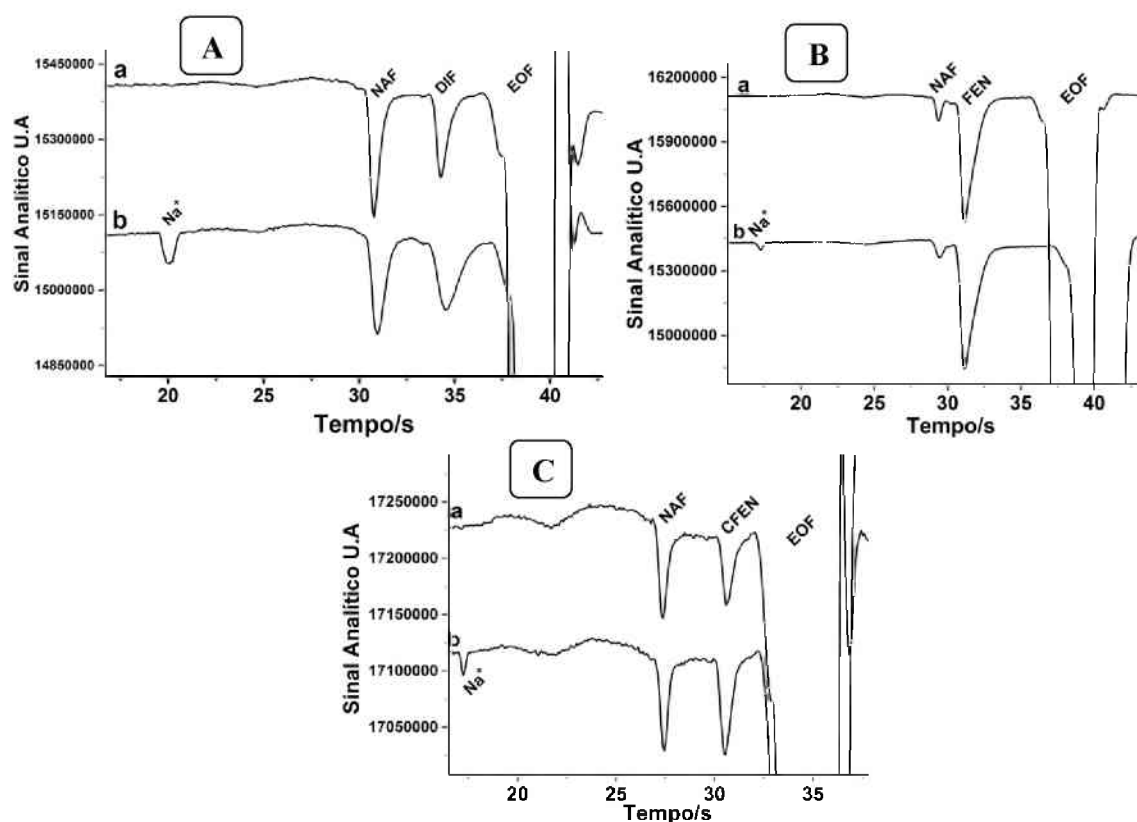


Figura 34 – Eletroferogramas obtidos com soluções padrões (a) e amostras (b) contendo NAF + DIF (A), NAF + FEN (B) e NAF + CFEN (C). Concentração dos analitos: (A) 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de DIF e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF; (B) 313 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CFEN e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e (C) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAF e 840 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FEN. BGE: 20 mmol L^{-1} de HIS com 10 mmol L^{-1} DMX e 1 mmol L^{-1} de NaOH (pH = 9,8); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,25 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

Tabela 8 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de NAF + DIF, NAF + FEN e NAF +CFEN via CE-C⁴D versus os obtidos por HPLC.

Amostra		Bula (mg mL ⁻¹)	EC (mg mL ⁻¹)	HPLC (mg mL ⁻¹)	Erro %	
					E ₁	E ₂
A1	NAF	1,00	0,930 ± 0,030	0,981 ± 0,020	- 7,0	- 5,1
	DIF	0,50	0,430 ± 0,025	0,410 ± 0,011	- 14,0	+ 4,6
A2	NAF	1,00	0,922 ± 0,037	0,931 ± 0,018	- 7,8	- 1,0
	DIF	0,50	0,430 ± 0,024	0,400 ± 0,007	- 14,0	+ 7,0
A1	NAF	0,25	0,269 ± 0,018	0,270 ± 0,003	+ 7,6	- 0,4
	FEN	3,00	3,366 ± 0,138	3,255 ± 0,019	+ 12,2	+ 3,3
A2	NAF	0,25	0,259 ± 0,023	0,273 ± 0,016	+ 3,5	- 5,1
	FEN	3,00	3,216 ± 0,085	3,045 ± 0,006	+ 7,2	+ 5,3
A1	NAF	0,50	0,465 ± 0,046	0,430 ± 0,012	- 7,0	+ 8,0
	CFEN	0,50	0,460 ± 0,027	0,433 ± 0,022	- 8,0	+ 6,0
A2	NAF	0,50	0,455 ± 0,027	0,423 ± 0,011	- 9,0	+ 7,0
	CFEN	0,50	0,450 ± 0,040	0,432 ± 0,015	- 10,0	+ 4,0

E₁: Diferença entre CE-C⁴D proposto e o valor que consta na bula; E₂: Diferença entre CE-C⁴D proposto e o método de referência.

Todos os resultados obtidos por CE-C⁴D estão de acordo com os obtidos por HPLC no nível de confiança de 95%, onde os valores de t calculados (teste t-Student pareado) foram menores do que o valor crítico teórico para todas as espécies quantificadas (2,78; N = 3), o que indica que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os resultados. As curvas de calibração também foram usadas para avaliar a exatidão do método CE-C⁴D proposto mediante estudos de adição e recuperação.

Os estudos de adição e recuperação apresentaram resultados satisfatórios, com recuperações de 96% ± 4 e 100% ± 4 (n = 3) para NAF e FEN e de 96% ± 2 e 101% ± 4 (n

= 3) para NAF e CFEN, respectivamente. Já para NAF e DIF, os valores de recuperações menores ($93\% \pm 3$ e $95\% \pm 5$ para NAF e DIF, respectivamente).

Provavelmente, os valores inferiores de recuperação obtidos se devem ao fato da elevada concentração de cloreto de sódio e cloreto de benzalcônio presentes como excipientes no medicamento, pois a força iônica na solução padrão é muito diferente da força iônica na amostra, o que leva a um comportamento diferente dos analitos no interior do capilar com a aplicação de um campo elétrico.

A fim de verificar tal suposição, 10 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio e 50 μmol L⁻¹ de cloreto de benzalcônio foram adicionados ao padrão de NAF e DIF, para comparação com a amostra e realização de um novo teste de adição e recuperação. Desta forma, uma outra curva de calibração foi construída utilizando soluções padrões com a adição de cloreto de benzalcônio e cloreto de sódio. Os eletroferogramas obtidos com a solução padrão sem (a), e com (b) a presença dos excipientes e de uma solução amostra (c) são apresentados na Fig. 35.

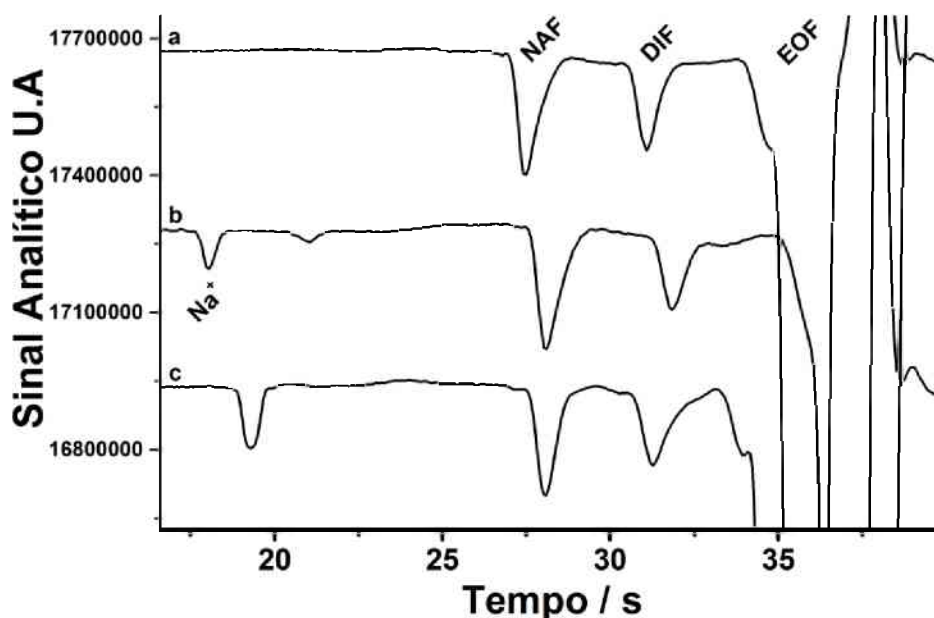


Figura 35 – Eletroferogramas de uma solução padrão sem (a) e com (b) com adição de 10 mmol L⁻¹ de NaCl e 50 μmol L⁻¹ de cloreto de benzalcônio e de uma solução amostra (c). Concentração dos analitos: 250 μmol L⁻¹ de DIF e 500 μmol L⁻¹ de NAF. BGE: 20 mmol

L^{-1} de HIS com $10\text{ mmol } L^{-1}$ DMX e $1\text{ mmol } L^{-1}$ de NaOH ($pH = 9,8$); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,25\text{ s}$; Potencial de separação: $+25\text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.

É visível que os picos da solução padrão contendo os excipientes (b) possuem picos com perfis mais similares aos da amostra (c). Nestas condições, os valores obtidos nos estudos de adição e recuperação apresentaram uma melhora significativa ($98\% \pm 2$ e $103\% \pm 2$ para NAF e DIF, respectivamente). Estes valores indicam que para se obter resultados com menor interferência de matriz deve-se construir a curva de calibração utilizando soluções padrão com a adição de cloreto de sódio e cloreto de benzalcônio.

4.3.1 Conclusões parciais

O método de CE proposto apresentou características analíticas adequadas para a determinação rápida ($115\text{ injeções } h^{-1}$) e simultânea de medicamentos contendo os seguintes princípios ativos: (1) NAF + DIF; (2) NAF + FEN ; (3) NAF + CFEN. Podemos destacar também o menor volume de resíduos gerados por análise (menor consumo de amostras e reagentes) em comparação com o método de HPLC descrito anteriormente (BARBAS, 2000) (HUANG et al., 2014).

5 CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, a técnica de CE-C⁴D foi usada com sucesso para o desenvolvimento de métodos para determinação rápida e simultânea dos seguintes princípios ativos presentes em formulações farmacêuticas:

- Difenidramina, piridoxina e 8-cloroteofilina;
- Nafazolina e difenidramina;
- Nafazolina e feniramina;
- Nafazolina e clorfeniramina e
- Nafazolina e zinco.

Todos os métodos desenvolvidos neste trabalho são simples, rápidos, de baixo custo de equipamento e manutenção, pois é utilizado um equipamento construído em laboratório. Além disso, possui baixo consumo de reagentes e amostras (custo e impactos ambientais menores).

Por isso, pode-se afirmar que os métodos propostos neste trabalho apresentam significativas vantagens em relação ao uso de HPLC que é a principal técnica utilizada rotineiramente para este tipo de análise. Todos os resultados obtidos com o sistema CE-C⁴D foram estatisticamente similares aos obtidos por HPLC (nível de confiança de 95%). A determinação simultânea de um íon metálico (Zn) e de uma molécula orgânica (NAF) pode ser considerado outra vantagem do sistema CE-C⁴D, pois a viabilidade desta análise por HPLC ainda não foi demonstrada.

No entanto, os métodos também possuem desvantagens, como a limitação na análise de amostras mais complexas (urina ou sangue), devido ao C⁴D ser um detector universal (detecção de uma gama enorme de compostos e comum co-migração).

Como perspectivas futuras, propõe-se ampliar a aplicabilidade de sistemas de CE- C^4D , pelo desenvolvimento de novos métodos rápidos para controle de qualidade de outros medicamentos. A princípio, o foco será direcionado às formulações farmacêuticas contendo moléculas orgânicas associadas a metais em polivitamínicos, que ainda é uma área pouco explorada em CE- C^4D .

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, N. W. et al. Simultaneous determination of naphazoline hydrochloride, chlorpheniramine maleate and methylene blue in their ternary mixture. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 641–648, 2013.

ALWARTHAN, A. A.; ALY, F. A. Chemiluminescent determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical samples using flow injection. **Talanta**, v. 45, n.6, p. 1131-1138, 1998.

ANICETO, C; FATIBELO-FILHO, O. Determinação espectrofotométrica por injeção em fluxo de vitamina b6 (piridoxina) em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 22, n. 6, 1999.

ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN M. D.; HUBBS, L. M. Limit of detection (lod) limit of quantitation (loq) - comparison of the empirical and the statistical, methods exemplified with gc-ms assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1233-1238, 1994.

BARBAS, C. et al. Optimization and validations of a method for the determinations of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography. Stress test for stability evaluation. **Journal of Chromatography A**, v. 870, p. 97-103, 2000.

BESSLER, K. E. et al. Preparação e caracterização espectroscópica de complexos de boro - uma proposta para uma prática integrada de Química Inorgânica. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1408-1411, 2010.

Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA), Resolution n. 47(2009).

BRITO-NETO, J. G. A. et al. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207-1214, 2005.

BRITO-NETO, J. G. A. et al. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1198-1206, 2005.

BUCARETCHI, F.; DRAGOSAVAC, S.; VIEIRA, R. J. Acute exposure to imidazoline derivatives in children. **Jornal de pediatria**, v. 79, n. 6, p. 519–524, 2003.

CALISEVICI, M. N. et al. Determination of anion and cation contents in Cyprus drinking waters by HPIC method. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 65-68, 2011.

CARVALHO, A. Z. Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato à determinação de espécies neutras. **Dissertação** (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CASADO-TERRONES, S. et al. A fluorescence optosensor for analyzing naphazoline in pharmaceutical preparations: Comparison with other sensors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 4, p. 785–789, 2005.

COLTRO, W. K. T. Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica. **Dissertação** (Mestrado em química analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

COLTRO, W. K. T.; DA SILVA, J. A. F.; CARRILHO, E. Rapid prototyping of polymeric electrophoresis microchips with integrated copper electrodes for contactless conductivity detection. **Analytical Methods**, v. 3, p. 168-172, 2011.

CRAFTS, C. et al. 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**, v. 47, n. 7, p. 534-539, 2009.

CRIADO, P. R. et al. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195–210, 2010.

CUNHA, R. R. et al. Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. **Journal of Separation Science**, v.38, p. 1657-1662, 2015.

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-C4D). **Dissertação** (Mestrado em química analítica). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DA SILVA, E. R. et al. Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2107-2111, 2013.

DA SILVA, J. A. F. Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 26, p. 56-64, 2003.

DA SILVA, J. A. F. et al. Fast determination of ethambutol in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 31, n. 3, p. 570-574, 2010.

DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, 1998.

DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. **Electrophoresis**, v. 21, n. 7, p. 1405-1408, 2000.

DE CARVALHO, L. M, et al. Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2203-2208, 2009.

de SANTANA, M. R.; TAVARES, M. F. M.; RUBIM, J. C. Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Atlanta, Georgia, U.S.A, 1997.

DEML, M.; FORET, F.; BOCEK, P. Electric sample splitter for capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 320, p. 159-165, 1985.

DEWANIA, A. P. et al. RP-HPLC-DAD method for the determination of phenylephrine, paracetamol, caffeine and chlorpheniramine in bulk and marketed formulation. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 5, p. 811–816, 2012.

DÍAZ, B. C, et al. Comparison of three different phosphorescent methodologies in solution for the analysis of naphazoline in pharmaceutical preparations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, n. 1, p. 30–34, 2004.

DIONEX. acesso: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/87447-PO-IICS-API-Counterion-CAD-18Oct2010-LPN2610-01.pdf>, acessado às 09:30h de 20/03/2016.

DOGE, U.; EGER, K. A simple HPLC-UV method for the determination of dimenhydrinate and related substances-identification of na unknown impurity. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 62, p. 174-178, 2007.

DOLZAN, M. D. et al. A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection. **Analytical Methods**, v. 5, p. 6023-6029, 2013.

DOUGHTY, M. J. A guide to ophthalmic pharmacy medicines in the United Kingdom. **Ophthalmic & physiological optics : the Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)**, v. 17, n. 1, p. S2–S8, 1997.

ESCANDAR, G. M.; BYSTOLB, A. J.; CAMPIGLIA, A. D. Spectrofluorimetric method for the determination of piroxicam and pyridoxine. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, n. 2, p. 275-283, 2002.

EVERAERTS, F. M.; BECKERS, J. L.; VERHEGGEN, T. P. E. M. Isotachophoresis Theory: Instrumentation and Applications. **Journal of Chromatography Library**, v. 6, 1976.

FAMACOPEIA AMERICANA. Disponível em: <http://www.usp.org/pt>. Acesso em abr. 2016.

FORET, F.; FANALI, S.; OSSICINI, L. Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 470, n. 1, p. 299-308, 1989.

FRANCISCO, K. J. M.; DO LAGO, C. L. A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **Electrophoresis**, v. 30, n. 19, p. 3458-3464, 2009.

FREITAS J. M. et al. Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Talanta**, v. 146, p. 670–6751, 2016.

FREITAS, C. B.; TAVARES, M. G. O.; COLTRO, W. K. T. Analysis of inorganic anions in environmental samples using glass electrophoretic microchips with contactless conductivity detection. **Talanta**, v. 147, p. 335-341, 2016.

FREITAS, J. M. et al. Development of a simple and fast electrochemical method for screening and stoichiometric determination of dimenhydrinate. **Electroanalysis**, v. 26, p. 1905-1911, 2014.

FUERSTENAU, D. W. Streaming Potential Studies on Quartz in Solutions of Aminium Acetates in Relation to the Formation of Hemi- micelles at the Quartz-Solution Interface. **Journal of physical chemistry**, v. 60, p. 981-985, 1956.

GALLAGHER, P. A.; DANIELSON, N. D. Capillary electrophoresis of cationic and anionic surfactants with indirect conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 781, n. 1-2, p. 533-540, 1997.

GIMENES, D. T. et al. Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. **Talanta**, v. 116, p. 1026-1032, 2103.

GOICOECHEA, H. C.; OLIVIERI, A. C. Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, n. 2, p. 289-300, 2002.

GUTZ, I. G. R., CurTiPot, pH and Acid–Base Titration, 2012. Disponível em: <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot.html>.

HALPERT A. G.; OLMSTEAD M. C.; BENINGER R. J. Mechanisms and abuse liability of the anti-histamine dimenhydrinate. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 61-67, 2002.

HALPERT, A. G.; OLMSTEAD, M. C.; BENINGER, R. J. Dimenhydrinate produces a conditioned place preference in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 173-179, 2003.

HAPUARACHCHI, S.; PREMEAU, S. P.; ASPINWALL, C. A. High-Speed Capillary Zone Electrophoresis with Online Photolytic Optical Injection. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3674-3680, 2006.

HAQUE, A.; STEWART, J. T. Simultaneous determination of codeine, caffeine, butalbital, and aspirin by free solution capillary electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n. 8, p. 1193-1204, 1999.

HARDMAN J. G, LIMBIRD L. E, GILMAN A. G. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**, ed. 10th. New York: McGraw-Hill, 2001.

HEIGER, D.N. High Performance Capillary Electrophoresis. **Hewlett Packard Company**, n. 12-5091-6199E, 1997.

HENDERSON, R. K. et al. Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 863-881, 2009.

HERBERTS, R. A. et al. Uso indiscriminado de descongestionantes nasais contendo nafazolina. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, n. 2, p. 103–108, 2006.

HJERTEN, S. Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, v. 9, n. 2, p. 122-219, 1967.

HJERTEN, S. High-performance electrophoresis - the electrophoretic counterpart of high-performance liquid-chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 270, p. 1-6, 1983.

HUANG, T. et al. A validated stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of pheniramine maleate and naphazoline hydrochloride in pharmaceutical formulations. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 7, 2014.

JAROS, M. et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3080-3085, 2004.

JOHNS, C. et al. Simultaneous separation of anions and cations by capillary electrophoresis with high magnitude, reversed electroosmotic flow. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, n. 2, p. 217-222, 2004.

JOHNSTON, S. E. et al. Expanded electrical model of a contactless conductivity detector: development and verification. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 148-157, 2005.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. Capillary zone electrophoresis. **Science**, v. 222, n. 4621, p. 266-272, 1983.

JORGENSEN, J. W.; LUKACS, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1298-1302, 1981.

KANETA, T.; TANAKA, S.; TAGA, M. Effect of cetyltrimethylammonium chloride on electroosmotic and electrophoretic mobilities in capillary zone electrophoresis. **Journal of chromatography A**, v. 653, p. 313-319, 1993.

KIRBY, D. A.; MILLER, C. L.; RIVIER, J. E. Separation of neuropeptide Y diastereomers by high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 648, p.257-265, 1993.

KROKHIN, O. V. et al. 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**, v.776, n. 2, p. 329-336, 1997.

KOENKA, I. J. et al. Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis – recent applications. **Analytical Methods**, v. 8, p. 1452-1456, 2016.

KUBA'N, P. et al. Separation of oxalate, formate and glycolate in human body fluid samples by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 241-246, 2014.

KUBA'N, P.; HAUSER, P. C. A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 15-29, 2008.

KUBA'N, P.; HAUSER, P. C. Effects of the cell geometry and operating parameters on the performance of an external contactless conductivity detector for microchip electrophoresis. **Lab Chip**, v. 5, p. 407-415, 2005.

KUBA'N, P.; HAUSER, P. C. Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behavior and cell geometry. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3387-3397, 2004.

KUBA'N, P.; HAUSER, P. C., Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part II: Signal-to-noise ratio and stray capacitance. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3398-3405, 2004.

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**, v. 964, n. 1-2, p. 227-241, 2002.

LABORDE-KUMMER, E. et al. Development and validation of a rapid capillary electrophoresis method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu (R) and

generic versions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 544-546, 2009.

LAMANI, S. D. et al. Voltammetric Determination of Chlorpheniramine Maleate Based on the Enhancement Effect of Sodium-dodecyl Sulfate at Carbon Paste Electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 347–354, 2011.

LAWSON, G.M. Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing - striving for a consensus. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1218-1219, 1994.

LOPES, F. S.; COELHO, L. H. G.; GUTZ, I. G. R. Automated two dimensional separation flow system with electrochemical preconcentration, stripping, capillary electrophoresis and contactless conductivity detection for trace metal ion analysis. **Electrophoresis**, v. 32, p. 939-946, 2011.

LOPES, F. S.; JUNIOR, O. A.; GUTZ, I. G. R. Fully electrochemical hyphenated flow system for preconcentration, cleanup, stripping, capillary electrophoresis with stacking and contactless conductivity detection of trace heavy metals. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 1387-1390, 2010.

Lucy, C. A. Underhill, R. S. Characterization of the Cationic Surfactant Induced Reversal of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, p.300-305, 1996.

LUTKA, A.; BUKOWSKA, H. Voltammetric determination of zinc in compound pharmaceutical preparations--validation of method. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 66, n. 5, p. 471–475, 2009.

MANOURI, O. C. et al. Three approaches to the analysis of zinc(II) in pharmaceutical formulations by means of different spectrometric methods. **Farmaco**, v. 53, n. 8-9, p. 563–569, 1998.

MARCHESINI, A. F. et al. Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 1, p. 39-46, 2003.

MARK, J. J. P.; SCHOLZ, R.; MATYSIK, F.M. Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1267, n. 0, p. 45-64, 2012.

MARRA, M. C. et al. Ultra-Fast Determination of Scopolamine, Orphenadrine, Mepyramine, Caffeine, Dipyrone, and Ascorbic Acid by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 25, n. 5, p. 913-919, 2014.

MARSH, A.; ALTRIA, K. Use of multiplexed CE for pharmaceutical analysis. **Chromatographia**, v. 64, n. 5-6, p. 327-333, 2006.

MARTENS, J. Determination of loratadine and pheniramine from human serum by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 673, n. 2, p. 183-188, 1995.

MENG, H. B. et al. Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography. **Talanta**, v. 76, n. 2, p. 241-245, 2008.

MIKKERS, F. E. P.; EVERAERTS, F. M.; VERHEGGEN, T. P. E. M. High-performance zone electrophoresis. **Journal Chromatography**, v. 169, p. 11-20, 1979.

MIKUŠ, P.; VALÁŠKOVÁ, I.; HAVRÁNEK, E. Enantioselective determination of pheniramine in pharmaceuticals by capillary electrophoresis with charged cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 3, p. 442-448, 2005.

MOODY, R. R.; TAYLOR, R. B. Determination of zinc in pharmaceutical preparations by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, n. 11, p. 848-852, 1972.

NEHMÉ, R. et al. 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**, v. 663, n. 2, p. 190-197, 2010.

NOUR EL-DIEN, F. A. et al. Modified screen printed and carbon paste ion selective electrodes for potentiometric determination of naphazoline hydrochloride in pure and pharmaceutical preparations. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 10, p. 10266–10281, 2012.

OLIVEIRA, F. C. **ADNAX: solução nasal**. Anápolis: Brainfarma. Bula de remédio.

OLIVEIRA, T. da C. et al. A batch injection analysis system with square-wave voltammetric detection for fast and simultaneous determination of naphazoline and zinc. **Talanta**, v. 152, p. 308-313, 2016.

ONUR, F. Simultaneous determination of pseudoephedrine sulfate, dexbrompheniramine maleate and loratadine in pharmaceutical preparations using derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative spectrophotometry. **Talanta**, v. 51, n. 2, p. 269-279, 2000.

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**, v. 109, n. 9, p. 4487-4499, 2009.

PIOVEZAN, M, *et al.* Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 673, n. 2, p. 200-205, 2010.

Protocolo: ProSort™ SDS-Protein Analysis by Capillary Electrophoresis; Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, 1993.

QU, W.; WU, K.; HU, S. Voltametric determination of pyridoxine (Vitamin B6) by use of a chemically-modified glassy carbon electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 631-635, 2004.

QUINLAN, J. D.; HILI D. A. Nausea and vomiting of pregnancy. **Am. Fam. Physician**, v. 68, p. 121-128, 2003.

RAFFA, R. B.; STONE, D. J.; TALLARIDA, R. J. Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 1, p. 291-294, 2000.

RICHARD, K. et al. Zinc-Histidine as Nucleation Centers for Growth of ZnS Nanocrystals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, p. 29–35, 2000.

RIGHETTI, P. G.; BOSSI, A. Isoelectric Focusing in Immobilized pH Gradients: Recent Analytical and Preparative Developments. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 1-10, 1997.

RIGHETTI, P. G.; Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Work, T. S. and Burdon, R. H. Eds.). **Elsevier, Amsterdam**, 1983.

SAARINORDHAUS, R.; ANDERSON, J. M. Simultaneous analysis of anions and cations by single-column ion chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 549, n. 1-2, p. 257-264, 1991.

SANTONI, G. et al. Simultaneous determination of naphazoline and diphenhydramine hydrochlorides in nasal drops by second-order derivative UV spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 50, p. 75-78, 1989.

SAKO, A. V. F., DOLZAN, M. D., MICKE, G. A. Fast and sensitive method to determine parabens by capillary electrophoresis using automatic reverse electrode polarity stacking mode: application to hair samples. **Analyses Bioanalytics Chemistry**, v. 407, p. 7333-7339, 2015.

SARAZIN, C. et al. Simultaneous capillary electrophoretic analysis of inorganic anions and cations in post-blast extracts of acid-aluminum mixtures. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 20, p. 3177-3183, 2010.

SÀSÁ, S. I.; AL-MOMANI, I. F.; JALAL, I. M. Determination of Naphazoline Nitrate and Antazoline Sulphate in Pharmaceutical Combinations by Reversed-Phase HPLC. **Analytical Letters**, v. 23, n. 6, p. 953-971, 1990.

SAYED, N. E. D. et al. Spectrophotometric, chemometric and chromatographic determination of naphazoline hydrochloride and chlorpheniramine maleate in the presence of naphazoline hydrochloride alkaline degradation product. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 51, n. 1, p. 57-68, 2013.

SCHUSTER, R.; GRATZFELD-HÜSGEN, A. CZE Analysis of Artificial Sweeteners and Preservatives in Drinks. **Hewlett Packard**, n. 12-5963-1122E, 1994.

SCUDI, J. V.; BASTEDO, W. A.; WEBB, T. J. The formation of a vitamin be-borate complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 136, p. 399-406, 1940.

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

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**, v. 67, n. 22, p. 4210-4216, 1995.

SHENG-LI, G. et al. Thermokinetics of the Formation Reaction of Zinc Histidine Complex. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 14-17, 2002.

SHIMADZU. acesso: <http://www2.shimadzu.com/applications/LC/IC%20L387.pdf>, acessado às 09:30h de 20/03/2016.

SHIMAZAKI, J.; SAKATA, M.; TSUBOTA, K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. **Archives of Ophthalmology**, v. 113, n. 10, p. 1266-1270, 1995.

SILVA, C. L. S. P. Eletroforese bidimensional: princípios e aplicações, **Ciê. Agr. Saúde FEA**, v. 2, n. 1, p. 74-78, 2002.

SIMONS, F. E. R. Comparative pharmacology of H1 antihistamines: clinical relevance. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 38-46, 2002.

SIMONS, F. E. R. H1-antihistamines: More relevant than ever in the treatment of allergic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 4, p. S42-S52, 2003.

ŠOLÍNOVÁ, V.; KAŠIČKA, V. Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 29, n.12, p. 1743-1762, 2006.

SWAIN, M. Software review. **Chemical Information Modeling**, v. 52, p. 613–615, 2012.

TAVARES, M. F. M. Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis. **Tese de doutoramento**, Michigan State University, 1993.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, 1996.

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

TAVARES, M. F.; COLOMABRA, R.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, p. 512-518, 1997.

TAVARES, M. F.; COLOMABRA, R.; MASSARO, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis: Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. **Journal of chromatography A**, v. 772, p.171-178, 1997.

TEIXEIRA, M. F. S.; MARINO, G.; DOCKAL, E. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Voltammetric determination of pyridoxine (Vitamin B6) at a carbon paste electrode modified with vanadyl(IV)–Salen complex. **Analytica Chimica Acta**, v. 508, n. 1, p. 78-95, 2004.

TERABE, S.; MATSUBARA, N. Microemulsion electrokinetic chromatography - comparison with micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 608, n. 1-2, p. 23-29, 1992.

THANH DUC, M.; HAUSER, P.C. Simultaneous separations of cations and anions by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection employing a sequential injection analysis manifold for flexible manipulation of sample plugs. **Journal of Chromatography A**, v. 1267, p. 266-272, 2012.

TIAN, H. et al. Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis by Capillary and Microchip Electrophoresis: A Fast, Simple Method for Detection of Common Mutations in BRCA1 and BRCA2. **Genomics**, v. 63, p.25-34, 2000.

TISELIUS, A. The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins. **Nova Acta Regional Societatis Scientist Upsaliensis**, v.7, n. 4, p. 107, 1930.

TOMOYOSHI, S.; ROSS, G. A. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 834, n. 1-2, p. 65-71, 1999.

VAN DER STEEN, C. et al. A.c. conductivity measurements in isotachophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 59, n. 2, p. 298-301, 1972.

VAZ, F. A. S.; DE OLIVEIRA, C. L. M.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentos de eletroforese capilar: Uma abordagem por animações. **Quimica Nova**, v. 38, n. 5, p. 732-737, 2015.

VITALI, L., et al. Using multiple short-end injections to develop fast electrophoretic separations—Applications in iodide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 4586-4591, 2011.

WALLINGFORD, R. A. Oligomeric Separation of Ionic and Nonionic Ethoxylated Polymers by Capillary Gel Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2541-2548, 1996.

WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ, M.; FIJAŁEK, Z. Polarographic determination of zinc in eye drops and validation of the method. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 55, n. 4, p. 263-266, 1998.

WEEKLEY, B. S.; FOLEY, J. P. Dual-opposite-injection CZE: Theoretical aspects and application to organic and pharmaceutical compounds. **Electrophoresis**, v. 28, n. 4, p. 697-711, 2007.

ZAHN, H. Über das Leitvermögen von starken Elektrolyten für Hochfrequenzströme, **Zeitschrift für Physik**, v. 51, n. 5, p. 350-354, 1928.

ZEMANN, A. J. Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 12-13, p. 2125-2137, 2003.

7 TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO PERÍODO

Rafael R. Cunha, Sandro C. Chaves, Michelle M. A. C. Ribeiro, Livia M. F. C. Torres, Rodrigo A. A. Muñoz, Wallans T. P. Dos Santos, Eduardo M. Richter. Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Separation Science*, v. 38, p. 1657–1662, 2015.

Michelle M. A. de C. Ribeiro, Jhony. M. Freitas, Rodrigo A. A. Muñoz, Claudimir L. do Lago and Eduardo M. Richter. Fast determination of diphenhydramine, pyridoxine, and 8-chlorotheophylline by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Analytical Methods*, v. 8, n. 22, p. 4432–4437, 2016.

Michelle M. A. de C. Ribeiro, Thiago C. Oliveira, Alex D. Batista, Rodrigo A. A. Muñoz, Eduardo M. Richter. A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc. *Journal of Chromatography A*, v. 1472, p. 134-137, 2016.

Rafael R. Cunha, Michelle M. A. C. Ribeiro, Rodrigo A. A. Muñoz and Eduardo M. Richter. Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, v. 40, n. 8, p. 1815–1823, 2017.

Artigo em redação

Michelle M. A. C. Ribeiro, Mariana C. Marra, Brenda M. C. Costa, Thiago C. Oliveira, Rodrigo A. A. Muñoz, Eduardo M. Richter. Ultra-fast determination of naphazoline, diphenhydramine, pheniramine and chlorpheniramine by capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection.