



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

RAFAEL RODRIGUES CUNHA

Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol e outros fármacos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).

Uberlândia

2017

RAFAEL RODRIGUES CUNHA

Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol e outros fármacos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Área de concentração: Química Analítica

UBERLÂNDIA

2017

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

C972d
2017 Cunha, Rafael Rodrigues, 1988-
Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol e outros fármacos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D). / Rafael Rodrigues Cunha. - 2017.
192 f.: il.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Farmacopeia - Teses. 3. Drogas - Pesquisa - Teses. 4. Química farmacêutica - Teses. I. Richter, Eduardo Mathias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 68/PPQUI.**

DATA: 26/05/2017

DISCENTE: Rafael Rodrigues Cunha

MATRÍCULA: 11313QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo paracetamol na presença de outros princípios ativos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D).

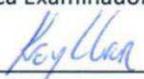
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

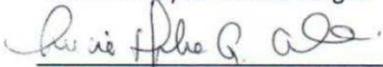
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas usando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato.

Às treze horas e trinta minutos do dia vinte e seis de maio do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Keyller Bastos Borges, da Universidade Federal de São João Del Rei, Lúcia Helena Gomes Coelho, da Universidade Federal do ABC, Sidnei Gonçalves da Silva e Anizio Marcio de Faria, da Universidade Federal de Uberlândia e Eduardo Mathias Richter, 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 Regulamentar nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) 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 aprovou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol e outros fármacos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D).

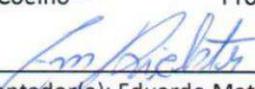
Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 60 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 19 horas e 37 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Keyller Bastos Borges – UFSJ


Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva – UFU


Profª Dra. Lúcia Helena Gomes Coelho –
UFABC


Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria – UFU


Professor(a) Orientador(a): Eduardo Mathias Richter – IQUFU



**"No que diz respeito
ao empenho, ao
compromisso, ao
esforço, à
dedicação, não
existe meio termo.
Ou você faz uma
coisa bem feita
ou não faz."**

Ayrton Senna

Agradecimentos

Nessas primeiras páginas eu gostaria de tornar público todo meu reconhecimento por aquelas pessoas que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para minha formação acadêmica. Caso eu tenha esquecido de alguém, peço gentilmente que me perdoem.

- À Deus, por estar sempre presente, me fornecendo força e paciência para aceitar as situações que não posso mudar, coragem para sempre seguir em frente e modificar as outras situações as quais eu posso mudar, e iluminando o caminho que percorro em minha vida com sabedoria para conseguir distinguir entre os dois tipos de situações.

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

- À minha amada namorada, Sarah, a qual tive a grande sorte de encontrar e poder trilhar junto meu caminho no final desta etapa do meu doutorado. Você é minha Ohana. Te agradeço primeiramente pela sintonia, tanto no trabalho quanto no doutorado, obrigado por me acompanhar, pela paciência em me aturar estressado e ansioso enquanto redigia esta tese, pela compreensão dos horários loucos e dificuldade de encontros até agora, pelas prazerosas horas ao seu lado, quase sempre na estrada, no nosso “Bilbo Baggins Way of Life”. Prometo te devolver todo este apoio quando chegar a sua vez no doutorado, e continuar para sempre viajando ao seu lado!

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

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

- Ao Prof. Dr. Frank-Michael Matysik, também pela orientação temporária, pela calorosa recepção em seu laboratório assim como pelos ensinamentos e todas as contribuições para meu crescimento, ainda aos colegas de trabalho que fiz durante a minha estadia na Alemanha: Gisela, Preety, Urška, Christian, Marco, Andreas e especialmente à paciente Andrea, ainda sinto falta de todos diariamente!

- A todos os amigos dos laboratórios de pesquisa do NuPE, os que ainda estão presentes e também os que passaram e encerraram sua jornada, bem como a outros colegas 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. Com carinho especial aos membros do Nupe: Mariana (Mari), Polyana P. (Poly “Pereirão”), David (Granola), Thiago (Tormin), Thiago (Costa), Jhonys, Luiz André (Sô), Michelle, Ana Paula, Jéssica, Rafael Melo. (Xará), Diego (Grilou), Weberson, Dani, Dudu, André Luiz (Clark), Brenda, Raquel; e aos que já foram do Nupe também especialmente Almir, Dalyelli, Gracy, Eduardo (Dudu), Polyana Luiza, Rafael (Dornas), Rodrigo (Cabeça) e Denise. Sentirei saudades dos nossos lanches, músicas e brincadeiras pelo resto da minha vida. Desejo a todos, toda a felicidade possível, além de uma vida pessoal e profissional repleta de realizações e sucesso!

- Ao meu ex colega de NuPE, compadre, irmão e o qual me aturou e foi aturado por mim durante toda a carreira científica no laboratório, agora terá que me aturar, até a aposentadoria, parceiro na Polícia Científica, Perito Criminal Dr. Rodrigo Henrique de Oliveira Montes, Banana!

- Aos idealizadores do livre conhecimento Aaron Swartz e Alexandra Elbakyan.

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

- À Pós Graduação em Química da UFU, bem como à Mayta, por toda ajuda, suporte, prontidão e boa vontade em solucionar, mesmo à distância, situações relacionadas ao doutorado.

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

- As “tias da limpeza” contratadas pelo Instituto pela paciência para esperar o fim de uma corrida, colaboração em não derrubar nenhuma solução já preparada e pelos momentos de descontração com os colegas na rampa durante o serviço.

- Ao Instituto de Química pelo espaço concedido e a todos os seus funcionários pela paciência, colaboração e amizade em todos os serviços prestados.

RESUMO

Este trabalho apresenta novos procedimentos analíticos que foram desenvolvidos para determinação rápida de paracetamol (PAR), na presença de codeína (COD), orfenadrina (ORP), prometazina (PRO), escopolamina (SCO), tramadol (TRA), ibuprofeno (IBU), cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF), ácido ascórbico (ASC) e naproxeno (NAP), com baixos tempos de corrida eletroforética inferiores à 2 minutos, sem pré-tratamento das amostras ou várias diluições, via eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D). O valor de pK_a para SCO foi obtido experimentalmente (pK_{aSCO} ≈ 10,2). Foram desenvolvidos cinco métodos distintos com diferentes eletrólitos de corrida (BGE), para determinação de PAR e analitos catiônicos orgânicos; BGE 1: 10 mmol L⁻¹ β-alanina + 4 mmol L⁻¹ NaCl + NaOH, (pH 9,6), para determinação de PAR e analitos aniônicos orgânicos quando na presença e também na ausência de CAF na composição do medicamento: para PAR, IBU e CAF foi usado BGE 2: 10 mmol L⁻¹ ácido 3,4-dimetoxicinâmico (DMX), 10 mmol L⁻¹ β-alanina + LiOH, pH = 10,4), para PAR e NAP; BGE 3: 20 mmol L⁻¹ β alanina + KOH, (pH = 10,5); e para PAR, DIP e AAS; PAR, PIR e ASC; e para PAR e DCF, o BGE 1, e na presença de CAF; o BGE 4: 10 mmol L⁻¹ DMX + 20 mmol L⁻¹ β-alanina + NaOH (pH = 10,4). Foi proposta a estratégia de utilizar NaCl na composição do BGE para elevar a condutividade deste, e assim, com uma melhora na relação sinal/ruído (SNR) do detector (melhorando a sensibilidade) para os analitos. Os métodos apresentaram baixos desvios padrões relativos em relação à área dos picos (< 2,2 %) e tempos de migração (< 0,9 %), bem como boas resoluções (> 1,34) entre os sinais analíticos de cada espécie. Foram obtidos coeficientes de correlação maiores que 0,989; e os ensaios de recuperação em formulações comerciais resultaram entre 91% e 104%. Foram obtidos limites de detecção (LOD) entre 0,6 e 48,7 μmol L⁻¹; os quais apesar de serem relativamente elevados, são mais que adequados para análise de produtos farmacêuticos. Os métodos propostos são rápidos (≈ 29 injeções por hora), com baixo consumo de reagentes de baixa toxicidade (≈ 3 mL de BGE por dia de trabalho) e, deste modo, baixa geração de resíduos, podendo ser considerado um método verde, indo ao encontro das tendências dentro da química analítica e ambiental.

Palavras chave: Análises rápidas, BGE salino, drogas lícitas, eletroforese capilar de zona, fármacos, medicamentos.

ABSTRACT

The present work shows new analytical procedures which were developed for fast determination of paracetamol (PAR), in the presence of codeine (COD), orphenadrine (ORP), promethazine (PRO), scopolamine (SCO), tramadol (TRA), ibuprofen (IBU), caffeine (CAF), acetyl salicylic acid (AAS), dipyron (DIP), pyridoxine (PIR), diclofenac (DCF), ascorbic acid (ASC) and naproxen (NAP), with low times of electrophoretic run, below 2 minutes, without pre-treatment of the samples or several dilutions, by capillary electrophoresis with contactless capacitance coupled conductometric detection (CE-C⁴D). SCO pK_a value was obtained experimentally (pK_{aSCO} ≈ 10.2). Five distinct methods were developed, with five distinct background electrolytes (BGE). For determination of PAR and the organic cationic analytes was used the BGE 1: 10 mmol L⁻¹ β-alanine + 4 mmol L⁻¹ NaCl + NaOH, (pH 9.6), for determination of PAR and the organic anionic analytes, in the presence and also in the absence of CAF on the drug formulation: for PAR, IBU and CAF was used the BGE 2: 10 mmol L⁻¹ 3,4-dimethoxycinnamic acid (DMX), 10 mmol L⁻¹ β-alanine + LiOH, pH = 10.4), for PAR and NAP; BGE 3: 20 mmol L⁻¹ β alanine + KOH, (pH = 10.5); and for PAR, DIP and AAS; PAR, PIR and ASC; and PAR with DCF, the BGE 1 was used. When CAF was present in the formulation, BGE 4: 10 mmol L⁻¹ DMX + 20 mmol L⁻¹ β-alanine + NaOH (pH = 10.4) was used instead of BGE 1. The strategy of use NaCl in the BGE composition was proposed to elevate the conductivity, thus, showing a better signal to noise ratio (SNR), improving the sensitivity for the analytes. The proposed methods shown low relative standard deviation for peak area (< 2.2 %) and for migration time (< 0.9 %). In addition, good resolutions (> 1.34) between the analytical signal from each species. Good linearity correlation were obtained (> 0.989); and accuracy procedures with commercial formulations has shown recovery of 91% to 104%. The limits of detections (LOD) were between 0.6 e 48.7 μmol L⁻¹; and despite these values can be considerably high, they are more than suitable for pharmaceutical analysis. The proposed methods are also fast (≈29 injections per hour), with low toxicity reagents consumption (≈ 3 mL of BGE per day of work) and, therefore, low residues generation, being considered a green method and agreeing with the analytical and environmental chemistry trends.

Keywords: Fast analysis, salty BGE, licit drugs, zone capillary electrophoresis, pharmaceuticals, medicines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equilíbrio ácido-base do PAR.	23
Figura 2 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para o paracetamol (PAR).....	24
Figura 3 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a escopolamina (SCO).....	24
Figura 4 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a orfenadrina (ORF).	25
Figura 5 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a tramadol (TRA).....	26
Figura 6 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a prometazina (PRO).	27
Figura 7 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a codeína (COD).....	29
Figura 8 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a ibuprofeno (IBU).	30
Figura 9 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a naproxeno (NAP).	31
Figura 10 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a dipirona (DIP).....	32
Figura 11 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a ácido acetilsalicílico (AAS).....	33
Figura 12 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a piridoxina (PIR).	34
Figura 13 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a ácido ascórbico (ASC).....	35
Figura 14 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a diclofenaco (DCF).....	36
Figura 15 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a cafeína (CAF).	37
Figura 16 - Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.	51
Figura 17 – Esquema ilustrativo da composição da superfície interna do capilar com EOF normal (A) e com EOF invertido (B).....	52
Figura 18 - Perfis dos fluxos eletrosmótico (a) e laminar (b), e suas correspondentes zonas de amostras.....	53
Figura 19 - Esquema do sistema de detecção C ⁴ D, onde E ₁ e E ₂ são os dois eletrodos do sistema de detecção.	64
Figura 20 - Esquema do sistema CE e modo de injeção hidrodinâmica (pressão positiva) usado nesse trabalho.....	77
Figura 21 - Imagem do equipamento de CE (com porta aberta) usado nesse trabalho, com destaque indicando a posição dos dois detectores C ⁴ D.	78
Figura 22 - Eletroferogramas apresentando a influência do pH nas misturas de padrões contendo 250 µM de SCO, TRA, ORP, PRO, e COD e 4280 µM de PAR. (A) pH 9,4; (B) pH 9,5; (C) pH 9,6 e (D) pH 9,7. BGE: 20 mmol L ⁻¹ β-alanina + 4 mmol L ⁻¹ NaCl com pH ajustado com NaOH; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 µm de diâmetro interno) com 40 cm de comprimento efetivo (50 cm de comprimento total).	83
Figura 23 - Eletroferogramas obtidos pela injeção uma solução padrão contendo 200 µmol L ⁻¹ de SCO e PI em MES/HIS 10mmol L ⁻¹ em concentração equimolar pH 6,0 (A) e em TRIS/TAPS 10 mmol L ⁻¹ em concentração equimolar pH 8,4 (B). Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 µm de diâmetro interno) com 40 cm de comprimento efetivo (L _D) e 50 cm de comprimento total (L _T).	86
Figura 24 -Eletroferogramas obtidos pela injeção de cátions (450 µmol L ⁻¹ cada) e PAR (10 mmol L ⁻¹), em diferentes BGE com concentrações crescentes de β-alanina (5, 10, 20, e 30 mmol L ⁻¹). *pico do sistema. Outras condições Figura 22.....	88

Figura 25 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de soluções padrões contendo os analitos com adição crescente de NaCl na composição do BGE: a) 0 mmol L ⁻¹ , b) 1 mmol L ⁻¹ , c) 4 mmol L ⁻¹ e d) 10 mmol L ⁻¹ . Outras condições, vide Figura 22.	90
Figura 26 – Eletroferogramas, em escala mais aproximada, obtidos pela injeção de soluções padrões contendo os analitos com adição crescente de NaCl na composição do BGE: a) 0 mmol L ⁻¹ , b) 1 mmol L ⁻¹ , c) 4 mmol L ⁻¹ e d) 10 mmol L ⁻¹ . Outras condições, vide Figura 22.	91
Figura 27 – Eletroferogramas, em escala mais aproximada, obtidos pela injeção de soluções padrões contendo os analitos na ausência (0 mmol L ⁻¹) e na presença (4 mmol L ⁻¹) de NaCl na composição do BGE. Outras condições, vide Figura 22.	92
Figura 28 - Curvas de calibração obtidas para ORP (0, 100, 200, 300, 400 e 500 µmol L ⁻¹) e PAR (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 µmol L ⁻¹) usando 20 mmol L ⁻¹ de β-alanina e 4 mmol L ⁻¹ de NaOH (pH 9.6) como BGE sem (∇) e com a adição de 1 (Δ), 4 (○), e 10 (□) mmol L ⁻¹ de NaCl.	93
Figura 29 - Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo SCO, TRA, ORP, PRO, COD (300 µmol L ⁻¹ de cada) e PAR (1000 µmol L ⁻¹). Pressão constante de injeção: 25 kPa; demais condições experimentais: idem Figura 22.	95
Figura 30 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de soluções padrão contendo: (A) 250 µmol L ⁻¹ de SCO, TRA, PRO, e COD e 3000 µmol L ⁻¹ de PAR; (B) 200 µmol L ⁻¹ de SCO, TRA, ORP, e COD e 3000 µmol L ⁻¹ de PAR. BGE: 20 mmol L ⁻¹ β-alanina + 4 mmol L ⁻¹ NaCl + 4 mmol L ⁻¹ NaOH (pH 9,6) outras condições, vide Figura 22.....	98
Figura 31 - Estudo de repetibilidade: Eletroferogramas obtidos por 20 injeções sucessivas de solução contendo padrões de 250 µmol L ⁻¹ de SCO, TRA, ORP, COD e 3 mmol L ⁻¹ de PAR. Outras condições, vide Figura 22.	99
Figura 32 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de solução padrão contendo SCO, TRA, ORP, COD (a-h: 100; 150; 200; 250; 350; 450; 550 e 650 µmol L ⁻¹ cada), e PAR (a-h: 1,5; 2,0; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L ⁻¹). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 22.	100
Figura 33 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de solução contendo SCO, TRA, PRO, COD (a-e: 100; 150; 200; 250 e 350 µmol L ⁻¹ cada), e PAR (a-e: 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L ⁻¹). Outras condições, vide Figura 22.	101
Figura 34 - Curvas analíticas para todos os analitos (A) ORP; (B) TRA; (C) SCP; (D) PRO; (E) COD e (F) PAR, obtidas pelo método CE-C ⁴ D proposto (n=3).	102
Figura 35 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de duas soluções padrão contendo concentrações idênticas entre si dos fármacos em proporções comercialmente disponível, sendo uma delas mantida na sombra (a) e outra exposta por 3 horas à radiação solar (b). P1, P2, P3 e P4 são picos desconhecidos. Outras condições, vide Figura 22.....	106
Figura 36 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de SCO e PAR. Sem (A) e com (B) zoom para melhor visualização do sinal da SCO. Outras condições, vide Figura 22.	109
Figura 37 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de TRA e PAR. Outras condições, vide Figura 22.....	110
Figura 38 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de COD e PAR. Outras condições, vide Figura 22.....	110
Figura 39 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de PRO e PAR. Sem (A) e com (B) zoom para melhor visualização do sinal da PRO. Outras condições, vide Figura 22.	111

Figura 40 - Eletroferogramas de soluções padrão contendo CAF, PAR e IBU (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada) Em três composições distintas de BGE (pH 10,4): (A) 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + LiOH; (B) 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + NH_4OH ; e (C) 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + KOH. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica à 25 kPa por 1,0 s.	115
Figura 41 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo 209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU em BGE com pH=10,0 (A); pH=10,4 (B); e pH=10,8 (C). *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.....	117
Figura 42 - Influência da concentração de DMX (10, 20 e 30 mmol L^{-1}) no BGE: Eletroferogramas apresentando as injeções de solução padrão contendo 209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU. Outras condições, vide Figura 40.....	118
Figura 43 - Eletroferograma contendo a injeção de uma mistura de solução padrão com CAF, PAR e IBU (1 mmol L^{-1} de cada) BGE: 10 mmol L^{-1} DMX, 10 mmol L^{-1} β -alanina e 15 mmol L^{-1} LiOH (pH = 10,4); *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 40.	119
Figura 44 – Estudo do tempo de injeção: eletroferogramas obtidos pela injeção de solução padrão contendo 209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU em diferentes tempos de injeção de a) 0,3 s; b) 0,6 s; c) 1,0 s; d) 1,5 s; e e) 2,0 s; em 25 kPa de pressurização. *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.	120
Figura 45 - Estudo do tempo de injeção: ampliação para melhor visualizar o sinal analítico da cafeína. Eletroferogramas obtidos pela injeção de solução padrão contendo 209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU em diferentes tempos de injeção de a) 0,3 s; b) 0,6 s; c) 1,0 s; d) 1,5 s; e e) 2,0 s; em 25 kPa de pressurização. *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.	121
Figura 46 – Estudo de repetibilidade: eletroferogramas apresentando 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU para estudo de repetibilidade. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 40.	123
Figura 47 – Eletroferogramas apresentando injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF (300; 400; 500; 600 e 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (1500, 3000, 4000, 6000 e 8000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e IBU (800, 1000, 1300, 1500 e 1800 $\mu\text{mol L}^{-1}$). * pico do sistema. *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.....	126
Figura 48 - Curvas de calibração obtidas para CAF (A), PAR (B) e IBU (C) com dados da Figura 47 (n=3).	127
Figura 49 - Eletroferogramas obtido pela injeção de uma solução preparada a partir da amostra farmacêutica comercial contendo CAF, PAR e IBU em sua formulação, apropriadamente diluída; *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 40.	128
Figura 50 - Comportamento eletroforético dos ânions: Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo os analitos aniônicos do grupo B (PAR+DIP+AAS), grupo C (PAR+PIR+ASC) e grupo D (PAR+DCF). BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina + 4 mmol L^{-1} NaCl, pH ajustado com NaOH; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 μm i.d.) com 40 cm de comprimento efetivo (50 cm de comprimento total). *pico de sistema.	132
Figura 51 - Eletroferograma apresentando comportamento da solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} β alanina com pH ajustado em 10,5 com adição de LiOH (10% etanol v/v). Outras condições, vide Figura 50.....	134

Figura 52 - Eletroferograma apresentando comportamento da solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} β alanina com pH ajustado em 10,5 com adição de NH_4OH (10% etanol v/v). Outras condições, vide Figura 50.....	134
Figura 53 - Eletroferograma apresentando comportamento da solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} β alanina com pH ajustado em 10,5 com adição de KOH (10% etanol v/v). Outras condições, vide Figura 50.	135
Figura 54 – (A) Eletroferogramas obtidos pelas injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de PAR, NAP e AAS (100, 300, 500, 900 e 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina com pH corrigido até 10,5 com NH_4OH e 10% etanol. Outras condições, vide Figura 50. Curvas de calibração para (B) PAR, (C) NAP e (D) AAS com dados obtidos dos eletroferogramas em (A).	136
Figura 55 - (A) Eletroferogramas obtidos com pelas injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de PAR, NAP e AAS (100, 300, 500, 700 e 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina com pH corrigido até 10,5 com KOH e 10% etanol. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50. Curvas de calibração para (B) PAR, (C) NAP e (D) AAS com dados obtidos dos eletroferogramas em (A).	137
Figura 56 - Eletroferogramas apresentando 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, NAP e AAS para estudo de repetibilidade. Outras condições, vide Figura 53.....	138
Figura 57 - (A) Eletroferograma apresentando injeção de solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, NAP e AAS. (B) Eletroferograma apresentando injeção de solução amostra contendo PAR e NAP, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 53...	140
Figura 58 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de duas soluções padrão contendo concentrações idênticas entre si dos fármacos, sendo uma delas mantida na sombra (a) e outra exposta por 3 horas à radiação solar (b). P1 corresponde ao pico desconhecido. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 53.	141
Figura 59 – Estudo de repetibilidade para analitos do Grupo B: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, DIP e AAS. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.....	143
Figura 60 – Estudo de repetibilidade para analitos do Grupo C: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, PIR e ASC. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.	143
Figura 61 – Estudo de repetibilidade para analitos do Grupo D: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR e DCF. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.	144
Figura 62 – Linearidade do grupo C: (A) Eletroferogramas apresentando injeções de soluções padrão contendo PAR (500, 750, 1250, 1750 e 2250 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PIR e ASC (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada); Curvas de calibração para (B) PAR, (C) PIR e (D) ASC obtidos com a partir dos dados dos eletroferogramas em (A). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.	146
Figura 63 - Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo CAF, PAR e DIP (150, 750 e 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada, respectivamente) no BGE composto por 10 mmol L^{-1} DMX + 20 mmol L^{-1} β -alanina + NaOH + 4 mmol L^{-1} NaCl; pH – 9,6. Pressão constante de injeção: 25 kPa. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.	147

Figura 64 – Estudo de repetibilidade para os analitos do grupo B na presença de CAF: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo CAF, PAR, DIP e AAS (150, 750, 900 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada, respectivamente). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.....	148
Figura 65 – Estudo de repetibilidade para os analitos do Grupo D na presença de CAF: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo CAF, PAR e DCF (150, 750 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada, respectivamente) para estudo de repetibilidade. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.	148
Figura 66 – Estudo da faixa linear de resposta para os analitos do grupo B na presença de CAF: (A) Eletroferogramas obtidos com injeções de soluções padrão contendo CAF (150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (750, 1250, 1750, 2250 e 2750 $\mu\text{mol L}^{-1}$), DIP (900, 1500, 2100, 2700 e 3300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e AAS (300, 500, 700, 900 e 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65. Curvas analíticas para (B) CAF, (C) PAR, (D) DIP e (E) AAS após tratamento de dados dos eletroferogramas.	150
Figura 67 – Estudo da faixa linear de resposta para os analitos do grupo D na presença de CAF: (A) Eletroferogramas obtidos com injeções de soluções padrão contendo CAF (150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (750, 1250, 1750, 2250 e 2750 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e DCF (150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65. Curvas analíticas para (B) CAF, (C) PAR e (D) DCF após tratamento de dados dos eletroferogramas.	151
Figura 68 - (A) Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de PAR e ASC, apropriadamente diluída. (B) Zoom para melhor visualização do sinal do ASC. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.	154
Figura 69 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de PAR e PIR, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.....	155
Figura 70 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de CAF, PAR e AAS, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65.....	155
Figura 71 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de CAF, PAR e DIP, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65.	156
Figura 72 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de CAF, PAR e DCF, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura molecular e outras características químicas de PAR, SCO, ORP, TRA, PRO, COD e IBU [11].	39
Tabela 2 - Estrutura molecular e outras características químicas de NAP, DIP, AAS, PIR, ASC, DCF e CAF [11].	40
Tabela 3 - Comparação das características dos métodos baseados em CE para determinação de PAR. ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	45
Tabela 4 - Efeito de algumas variáveis no desempenho de um sistema de CE.	54
Tabela 5 - Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.	60
Tabela 6 - Composição do BGE em cada um dos métodos propostos.	76
Tabela 7 - Valores de tempo de migração (t_m e t_0 ; \pm SD; $n=3$), mobilidade limite (μA^- ; \pm SD – $n=3$) em MES/HIS 10 mmol L^{-1} em concentração equimolar (pH 6,0) e mobilidade eletroforética (μeff ; \pm SD – $n=3$) em TRIS/TAPS 10 mmol L^{-1} em concentração equimolar (pH 8,4) de COD (PI) e SCO.	87
Tabela 8 - Mudanças observadas nos coeficientes de correlação e inclinações (slope) das curvas de calibração dos analitos alvos, pela adição de NaCl na composição do BGE.	94
Tabela 9 - Condições otimizadas para o método de CE-C ⁴ D proposto.	97
Tabela 10 - Características analíticas do método proposto (^a $\mu\text{mol L}^{-1}$, ^b Regressão linear: Sinal analítico = $a + b$ [analito]).	104
Tabela 11 - Resultados (média \pm desvio padrão; $n = 3$) obtidos pela determinação dos princípios ativos contidos em cinco amostras farmacêuticas usando o método CE-C ⁴ D proposto.	105
Tabela 12 - Possíveis candidatos à produtos de degradação aniônicos da PRO.	107
Tabela 13 - Comparação dos resultados (media \pm desvio padrão; $n = 3$) obtidos em cinco temperaturas distintas para os sinais analíticos em unidades arbitrárias (A.U.) e tempos de migração em segundos (s).	122
Tabela 14 – Comparação entre os resultados e características analíticas obtidos durante a comparação do método proposto, e de métodos publicados anteriormente para determinação simultânea de CAF, PAR e IBU.	125
Tabela 15 - Comparação dos resultados obtidos, em mg/comprimido (média \pm SD; $n = 3$) para determinação simultânea de PAR, CAF e IBU em amostras farmacêuticas pelo método CE-C ⁴ D proposto e por HPLC [154].	129
Tabela 16 – Comparação dos resultados analíticos obtidos pelo método proposto e HPLC [139] para determinação simultânea de PAR e NAP em formulações farmacêuticas ($n=3$), e as respectivas recuperações ($n = 3$) por CE-C ⁴ D.	140
Tabela 17 - Características analíticas do método CE-C ⁴ D proposto para os analitos aniônicos.	153
Tabela 18 - Resultados (média \pm desvio padrão; $n = 3$) obtidos da determinação dos princípios ativos aniônicos presente em cinco amostras farmacêuticas usando o método CE-C ⁴ D proposto.	157

LISTA DE ABREVIACÕES

A.U. - Unidade arbitrária (*arbitrary unit*)

AAS - Ácido Acetilsalicílico

ACE - Eletroforese capilar de afinidade (*Affinity capillary electrophoresis*).

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC - Ácido Ascórbico

BGE - Eletrólito de corrida (*Background electrolyte*)

C⁴D - Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (*Contactless Capacitive Coupled Conductivity Detection*)

CAF - Cafeína

CE - Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

COD - Codeína

CSE - Eletroforese capilar de peneiramento (*Capillary sieving electrophoresis*)

CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio (*Cetyltrimethylammonium bromide*)

CZE - eletroforese capilar de zona (*Capillary zone electrophoresis*)

DAD - Detecção por rede de diodos

DCF - Diclofenaco

DIP - Dipirona

DMX - Ácido 3,4 dimetóxicinâmico

DPR - Desvio padrão relativo

EKC - Cromatografia electrocinética (*Electrokinetic chromatography*)

EOF - fluxo eletrosmótico (*Electroosmotic flow*)

EUA – Estados Unidos da América

HIS - Histidina

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography*)

IBU - Ibuprofeno

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LOD - Limite de detecção (*Limit of detection*)

MEECK - Cromatografia eletrocinética em microemulsão (*Microemulsion electrokinetic chromatography*)

MES – Ácido 2-[N-morfolino] etano sulfônico

NaDCF - Diclofenaco de Sódio

NAP - Naproxeno

ORP - Orfenadrina

OXA - Oxalato

PAR - Paracetamol

PI - Padrão interno (*Internal Standard*)

PIR - Piridoxina

PRO - Prometazina

PTFE - Politetrafluoretileno (“*Teflon*®”)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SCO - Escopolamina

SDS - Dodecilsulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

SNC - Sistema nervoso central

SNR - Razão sinal/ruído (*Signal Noise ratio*)

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

TEA - Trietanolamina

TRA - Tramadol

TRIS - propano 2-Amino-2-hidroximetil-1,3diol

LISTA DE EQUAÇÕES

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

$$\mu_{ep} = \frac{z \times e}{f} \quad (2)$$

$$\mu_{ep} = \frac{z \times e}{6\pi r \eta} \quad (3)$$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_r \times \varepsilon_0 \times \zeta}{\eta} \quad (4)$$

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E \quad (5)$$

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \times \mu_j \quad (6)$$

$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \quad (7)$$

$$v_{ap} = v_{ef} \pm v_{EOF} \quad (8)$$

$$\mu_{ef} = \frac{\mu_{A-}}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad (9)$$

$$pKa = pH + \log \frac{\mu_{A-} - \mu_{ef}}{\mu_{ef}} \quad (10)$$

$$\mu = \frac{L_T L_D}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (11)$$

$$pKa_{SCO} = pKa_{PI} + \log \left(\frac{\mu_{A-SCO} - \mu_{efSCO}}{\mu_{efSCO}} \right) - \log \left(\frac{\mu_{A-PI} - \mu_{efPI}}{\mu_{efPI}} \right) \quad (12)$$

$$t_m = \frac{l \times L}{E \times (\mu_{ep} + \mu_{eo})} \quad (13)$$

$$N = \frac{\mu_{ep} \times E}{2 \times D} \quad (14)$$

$$N = \frac{\left(\frac{lL}{t_m} \right) - E \times \mu_{eo}}{2 \times D} \quad (15)$$

Sumário

1	Introdução.....	21
1.1	Paracetamol e suas associações.....	21
1.2	Determinação de fármacos.....	41
1.3	Breve histórico sobre eletroforese capilar.....	46
1.4	Teoria básica da eletroforese capilar.....	48
1.5	Modalidades eletroforéticas de análise.....	56
1.5.1	Eletroforese capilar de zona (CZE).....	56
1.5.2	Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).....	57
1.5.3	Eletroforese capilar em gel (CGE).....	57
1.5.4	Eletrocromatografia capilar (CEC).....	58
1.5.5	Isotacoforese capilar (CITP).....	58
1.5.6	Focalização isoelétrica capilar (CIEF).....	59
1.5.7	Eletroforese capilar de afinidade (ACE).....	59
1.6	Detectores em CE.....	59
1.6.1	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C ⁴ D).....	63
1.7	Análises por CE.....	67
1.8	Determinação simultânea de compostos catiônicos e aniônicos orgânicos.....	69
1.9	Adição de NaCl ao BGE.....	71
2	Objetivos.....	73
3	Parte experimental.....	74
3.1	Reagentes e amostras.....	74
3.2	Instrumentação.....	77
4	Resultados e discussões.....	80
4.1	Parte I: Desenvolvimento de um novo método para determinação simultânea de PAR e cátions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas.....	80
4.1.1	Estudo da composição do BGE.....	81
4.1.2	Determinação do pKa da SCO.....	84
4.1.3	Estudo da concentração dos componentes do BGE.....	88
4.1.4	Estudo da influência de NaCl no BGE.....	89
4.1.5	Avaliação das melhores condições dos parâmetros do método proposto.....	94
4.1.6	Estudo de repetibilidade.....	98

4.1.7 Estudo de linearidade.....	99
4.1.8 Avaliação do LOD e precisão	102
4.1.9 Aplicação do método proposto.....	103
4.1.10 Estudo da degradação induzida via exposição solar	106
4.1.11 Apresentação do comportamento eletroforético das amostras	108
4.1.12 Conclusões parciais	112
4.2 Parte II: Desenvolvimento de novos métodos para determinação simultânea de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas.....	113
4.2.1 Desenvolvimento de um método para determinação simultânea de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas contendo ibuprofeno (IBU) e cafeína (CAF).....	114
4.2.1.1 Avaliação do BGE com distintas bases para correção de pH	115
4.2.1.2 Avaliação do valor de pH.....	116
4.2.1.3 Avaliação da concentração do DMX.....	117
4.2.1.4 Avaliação do tempo de injeção	119
4.2.1.5 Avaliação da robustez em relação à temperatura do sistema.....	121
4.2.1.6 Avaliação das figuras de mérito	122
4.2.1.7 Estudo da linearidade e calibração analítica.....	126
4.2.1.8 Aplicação do método proposto em amostras reais e comparação dos resultados via HPLC.....	128
4.2.2 Desenvolvimento de método para determinação de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas contendo cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF), ácido ascórbico (ASC) e naproxeno (NAP).....	130
4.2.2.1 Método para determinação dos ânions do Grupo A: PAR+NAP +AAS.....	133
4.2.2.1.1 Avaliação do BGE com diferentes bases	133
4.2.2.1.2 Estudo de linearidade e calibração analítica.....	136
4.2.2.1.3 Estudo de repetibilidade	138
4.2.2.1.4 Aplicação do método proposto em amostras reais e comparação dos resultados via HPLC.....	139
4.2.2.1.5 Estudo da degradação induzida via exposição solar.....	141
4.2.2.2 Método para determinação dos ânions dos grupos B, C e D:.....	142
4.2.2.2.1 Estudo de repetibilidade	143
4.2.2.2.2 Estudo de linearidade e calibração analítica.....	145
4.2.2.2.3 Avaliação do tempo de injeção do BGE para presença de CAF.....	146
4.2.2.2.4 Estudo de repetibilidade do BGE para presença de CAF.....	147

4.2.2.2.5 Estudo de linearidade e calibração analítica do BGE para presença de CAF	149
4.2.3 Conclusões parciais	158
5 Conclusões gerais e perspectivas futuras	159
6 Referências bibliográfica	161
7 Trabalhos desenvolvidos no período	189
7.1 Artigos publicados no período	189
7.2 Artigos em redação	192

1 Introdução

No início do século XXI, cerca de 100 mil substâncias químicas distintas haviam sido reconhecidas na União Europeia, sendo que aproximadamente 30 mil destas eram produtos comercializados em quantias acima de 1 tonelada e em torno de 4 mil eram usadas como drogas ou na medicina [1]. O progresso na medicina é atrelado à problemas como o aumento de contaminantes emergentes no meio ambiente, bem como a produção de microorganismos patogênicos mais resistentes. Tal progresso, associado ao aumento populacional e à modernização, tornou a sociedade cada vez mais intrinsecamente dependente de uma vasta gama de produtos químicos ao longo da sua evolução e, dentre estes produtos, a dependência dos fármacos. Dentre estes, alguns medicamentos contendo paracetamol e outros princípios ativos em sua composição estão presentes e são consumidos diariamente por boa parte da humanidade.

1.1 Paracetamol e suas associações

O paracetamol (PAR) ou acetaminofeno é uma droga conhecida e comercializada mundialmente com aproximadamente 25 bilhões de comprimidos vendidos em 2008 [2], e movimentando mais de 230 milhões de dólares americanos em 2014 Estados Unidos da América (EUA) [3]. No Brasil, sem necessidade de receita médica, PAR é comercializado sob o nome “Tylenol®”, ou na forma genérica, apenas como “Paracetamol”, tanto em gotas quanto em comprimidos. De nome IUPAC N-(4-hidroxifenil) acetamida, é usado devido aos seus efeitos antipiréticos e analgésicos. PAR é comumente encontrado em associação com outros fármacos como: codeína (COD), orfenadrina (ORP), prometazina (PRO), escopolamina (SCO), tramadol (TRA), ibuprofeno (IBU), cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF), ácido ascórbico (ASC) e naproxeno (NAP), devido às potencialidades farmacológicas provenientes do efeito sinérgico obtido ao se consumir tais drogas simultaneamente [4].

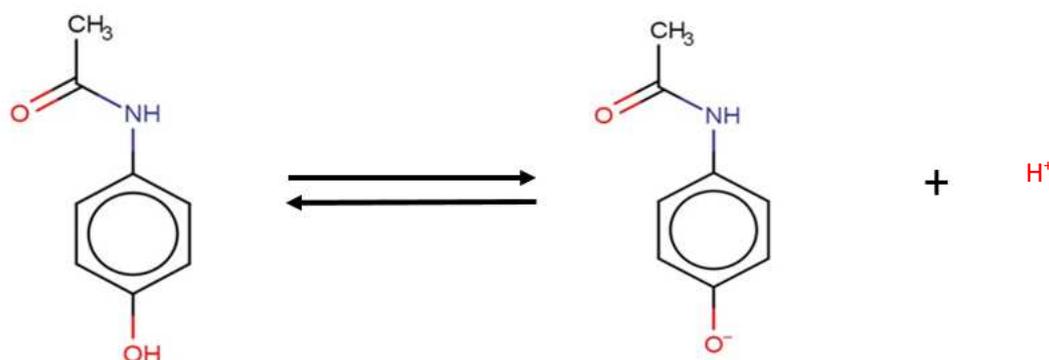
Sinergismo é descrito como sendo a interação entre duas drogas tal que, quando administradas concomitantemente, a eficácia ou potência resultante suporta uma interação maior do que aditivo ou multiplicativo quando comparada com cada fármaco administrado individualmente [5-7].

Assim, PAR pode ser encontrado comercialmente combinado com várias substâncias com a finalidade de se ter um efeito sinérgico ou adjuvante, potencializando

o efeito destes fármacos. Quando combinado com orfenadrina (ORP), é indicado para o alívio da dor muscular em cefaléia tensional; com tramadol (TRA) para aumentar a analgesia e redução de efeitos colaterais; com codeína (COD) para tratar dor aguda e pirexia; com prometazina (PRO) a ser utilizado como antipirético e antiemético; com a escopolamina (SCO) em terapia para distúrbios gastrointestinais, como cólicas; com dipirona (DIP) e com ácido acetilsalicílico (AAS) para elevar o potencial analgésico e antipirético; com diclofenaco (DCF), ibuprofeno (IBU) e naproxeno (NAP) para potencializar o efeito anti-inflamatório; com piridoxina (PIR) e ácido ascórbico (ASC) para tratar resfriados; e com cafeína (CAF) como adjuvante para acelerar a absorção de outras drogas, além de elevar a tolerância à dor.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira [8], PAR encontra-se isolado na forma de pó cristalino branco, inodoro, com leve sabor amargo, sendo ligeiramente solúvel em água, solúvel em água fervente, facilmente solúvel em etanol, praticamente insolúvel em clorofórmio e éter etílico, possuindo ainda faixa de fusão entre 168 °C e 172 °C [8]. Von Mering introduziu seu uso para alívio de dores e redução da temperatura corporal em 1893, como um substituto para a aspirina devido ao fato de PAR não agredir a parede estomacal em pacientes sensíveis ao ácido acetilsalicílico (AAS), princípio ativo da aspirina [9]. Apesar de não causar gastrites e úlceras no estômago, PAR é conhecido por ser extremamente hepatotóxico [10].

As moléculas de PAR possuem um equilíbrio ácido-base com valor de pKa próximo de 9,5 [11]. Esse estado de equilíbrio químico dinâmico apresenta razão entre as moléculas apresentadas na Figura 1, em que as concentrações das moléculas de PAR neutras (esquerda, Figura 1) e dos ânions PAR (direita, Figura 1) são constantes. Essa razão constante é dinâmica no sentido de que a proporção entre as duas estruturas moleculares de PAR não se altera, pois, à medida que uma molécula de PAR neutra perde um H⁺, um ânion PAR reage com este (ou outro proveniente do meio) hidrogênio catiônico em excesso e se transforma em outra molécula de PAR neutra, restaurando as condições anteriores de concentração de cada espécie, para manutenção do equilíbrio. Em outras palavras, tal razão é constante, pois a velocidade da reação de desprotonação é precisamente igual à velocidade da reação de neutralização.

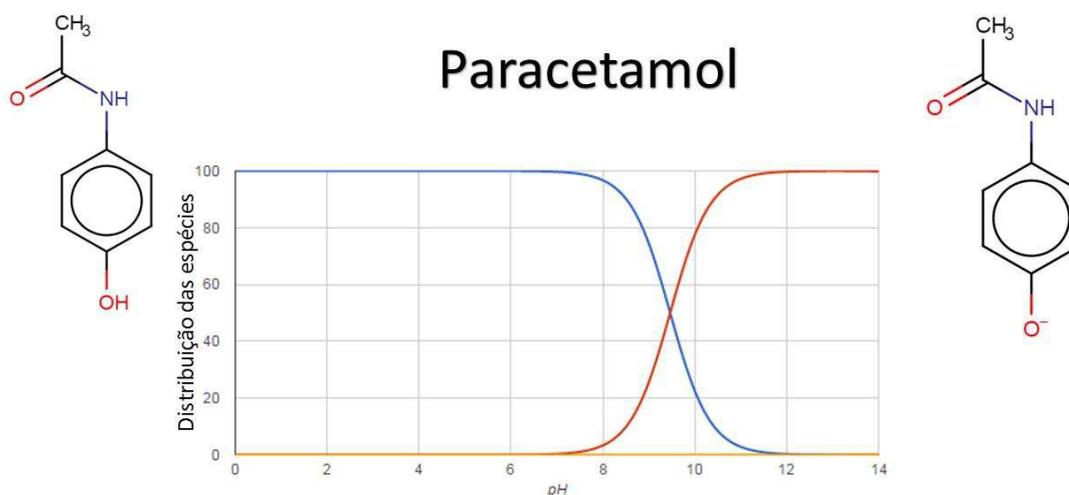
Figura 1 - Equilíbrio ácido-base do PAR.

Fonte: Autor (2017).

Entretanto, essa relação de equilíbrio pode ser alterada ao se aplicar uma perturbação no sistema, tais perturbações podem ser desde variações na temperatura, na pressão (caso um dos compostos fosse gasoso) e/ou principalmente elevando ou diminuindo a concentração total de uma espécie, pela adição/remoção de espécies que compõem o equilíbrio. Um exemplo deste caso seria adicionar H⁺ no equilíbrio da Figura 1, com intuito de deslocar o mesmo para favorecer a formação da espécie de PAR neutra.

De acordo com o princípio de Le Châtelier [12], o equilíbrio químico sempre se altera no sentido de suprir e minimizar o efeito causado pela perturbação do sistema. Como o H⁺ é uma das espécies envolvidas no equilíbrio ácido-base do PAR, bem como de outras espécies presentes neste trabalho, a alteração da concentração deste cátion em solução afeta diretamente os equilíbrios das espécies. No caso do PAR, em solução com valores de pH de 1 até aproximadamente 7,5 prevalece a existência da forma neutra das moléculas. Em torno de pH 8, apenas cerca de 5 % de suas moléculas apresentam carga negativa (em forma de ânion), enquanto cerca de 95 % das moléculas envolvidas neste equilíbrio dinâmico estão sem carga (na sua forma neutra). À medida em que se eleva o valor do pH da solução contendo PAR, a porcentagem de moléculas na forma aniônica (desprotonadas) vai aumentando até atingir 100 % em pH próximo 11,5; conforme pode ser observado na Figura 2, a qual apresenta o equilíbrio ácido-base fundamentado na distribuição das espécies de PAR em função do pH da solução.

Figura 2 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para o paracetamol (PAR).

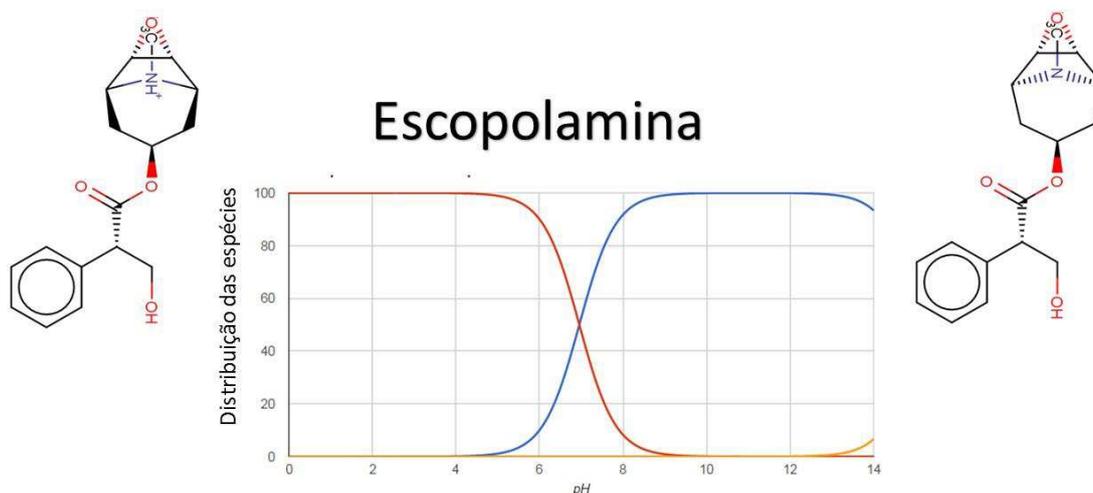


Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

A SCO é encontrada na forma de butilbrometo de escopolamina e apresenta-se como pó cristalino branco ou quase branco. A molécula é facilmente solúvel em água e em cloreto de metileno, pouco solúvel em etanol e possui faixa de fusão entre 139 °C e 141 °C [8]. SCO é um alcaloide com efeitos analgésicos, sedativos e anticonvulsivos. Em casos de abuso no seu consumo, pode ainda prejudicar temporariamente a habilidade de se reter novas informações, de fixar atenção, vindo a gerar alucinações auditivas e visuais, seguidas de desorientação, euforia e fadiga [13].

Segundo a literatura [11], SCO possui um valor de pKa de 6,5 conforme apresentado na Figura 3.

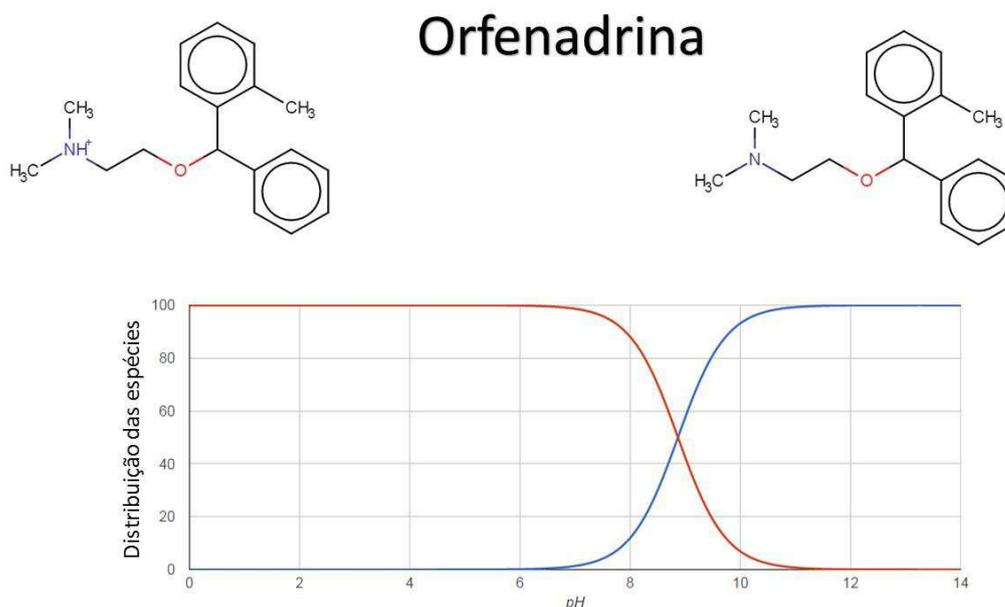
Figura 3 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a escopolamina (SCO).



Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

A ORP, apesar de ausência de informações na Farmacopeia Brasileira, é um fármaco com propriedades da classe dos antimuscarínicos, utilizados principalmente para tratamento dos tremores da doença de Parkinson. Tem atuação no sistema nervoso central, reduzindo as dores dos espasmos musculares, podendo ser utilizado ainda no tratamento de dores agudas e crônicas infligidas nos músculos esqueléticos [14]. Em solução, as moléculas de ORP possuem um equilíbrio ácido-base que resulta em um valor de pKa próximo de 8,9 [11] e, portanto, em solução com pH em torno de 8, cerca de 80% de suas moléculas apresentam carga positiva (em forma de cátion), enquanto aproximadamente 20 % das moléculas envolvidas neste equilíbrio dinâmico estão sem carga (na sua forma neutra). À medida em que se eleva o valor do pH da solução contendo as moléculas de ORP, a porcentagem de moléculas na forma catiônica (protonadas) vai diminuindo, perdendo totalmente sua carga em pH 11, conforme pode ser observado na Figura 4, a qual apresenta a distribuição das espécies de ORP em função do pH da solução.

Figura 4 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a orfenadrina (ORF).



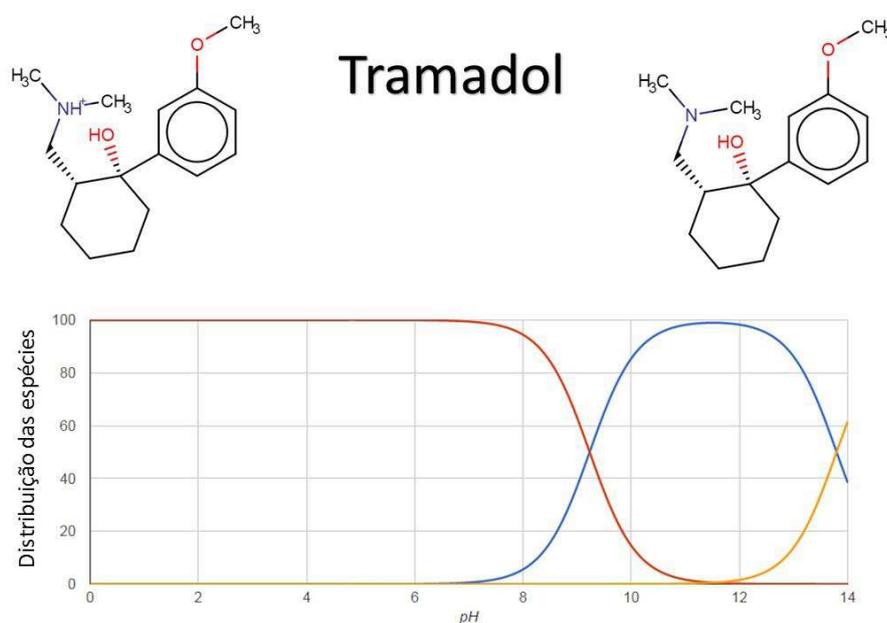
Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

TRA pode ser encontrado na forma de pó cristalino branco e inodoro, sendo solúvel em água, etanol e metanol e muito pouco solúvel em acetona. Com faixa de fusão de 180 °C a 184 °C [8]. TRA é um analgésico sintético e de atuação central introduzido inicialmente na Alemanha em 1977, para se tornar um dos miméticos de opióides mais

prescritos mundialmente, por causar menos efeitos colaterais do que estes, como depressão respiratória e dependência química [15]. Devido aos seus efeitos, TRA é usado para tratar dores agudas e crônicas de grau moderado a severo [16].

Uma solução que contenha TRA, possui suas moléculas em um equilíbrio ácido-base que resulta em um valor de pK_a próximo de 9,2 [11] e, desta forma quando em solução com pH em torno de 8, cerca de 85% de suas moléculas apresentam carga positiva (em forma de cátion), enquanto aproximadamente 15 % das moléculas envolvidas neste equilíbrio dinâmico estão sem carga (na sua forma neutra). À medida em que se eleva o valor do pH da solução contendo moléculas de TRA, a porcentagem de moléculas na forma catiônica (protonadas) vai diminuindo, perdendo totalmente sua carga em pH 11, conforme pode ser observado na Figura 5, a qual apresenta a distribuição das espécies de TRA em função do pH da solução. Ainda há outro equilíbrio para TRA, em valor de pK_a 13,8; proveniente de uma espécie aniônica do TRA.

Figura 5 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a tramadol (TRA).



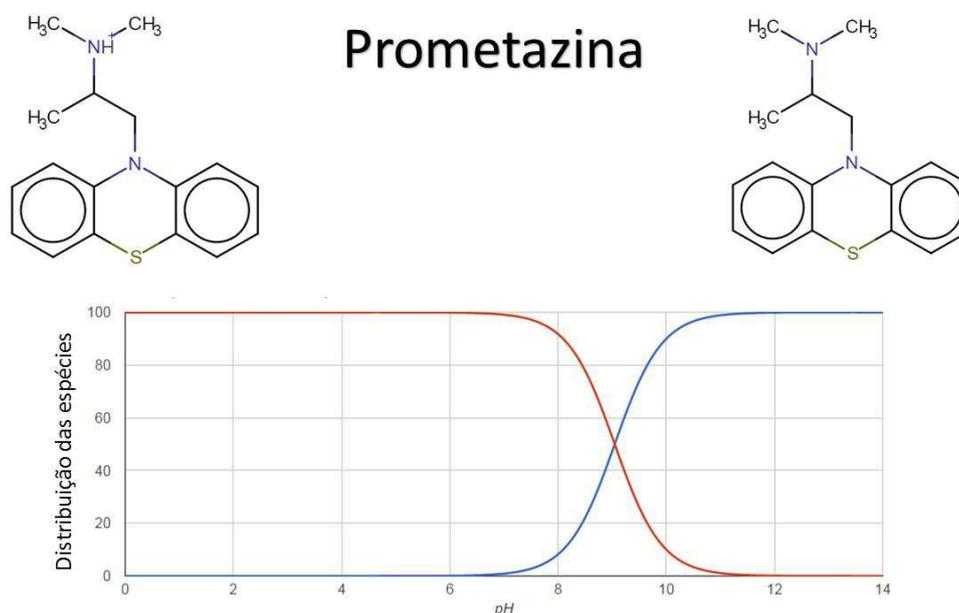
Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

Prometazina (PRO) consta na Farmacopeia Brasileira na forma isolada de cloridrato, como sendo um pó cristalino, branco a levemente amarelado, inodoro, sabor amargo. Funde em torno de 222 °C, com decomposição. Facilmente solúvel em água, etanol e clorofórmio, no entanto, é praticamente insolúvel em éter etílico [8]. PRO, é um

anti-istamínico com propriedades para tratamentos em que se necessita de efeito sedativo e antipsicótico, além de analgésico e anticolinérgico, podendo causar efeitos colaterais graves como disfunções endócrinas, cardíacas e reprodutivas [17]. Associada à opiáceos como a COD e PRO pode ser utilizada como drogas de abuso ao ser ingerida na forma de xarope com bebidas alcoólicas, sendo reportados efeitos psicotrópicos, alucinógenos e até morte por overdose [18].

Em solução, as moléculas de PRO possuem um equilíbrio ácido-base que resulta em um valor de pKa próximo de 9,1 e, portanto, em solução com pH em torno de 8, cerca de 80% de suas moléculas apresentam carga positiva (em forma de cátion), enquanto que aproximadamente 20% das moléculas envolvidas neste equilíbrio dinâmico estão sem carga (na sua forma neutra). À medida em que se eleva o valor do pH da solução contendo moléculas de PRO, a porcentagem de moléculas na forma catiônica (protonadas) vai diminuindo, com o equilíbrio perdendo totalmente sua carga em pH 11, conforme pode ser observado na Figura 6, a qual apresenta a distribuição das espécies de PRO em função do pH da solução.

Figura 6 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a prometazina (PRO).



Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

A COD é geralmente isolada na forma de um sal de fosfato, na forma de um pó cristalino branco ou quase branco, ou cristais pequenos e incolores. Facilmente solúvel em água e pouco ou muito pouco solúvel em etanol [8]. COD é um fármaco utilizado no

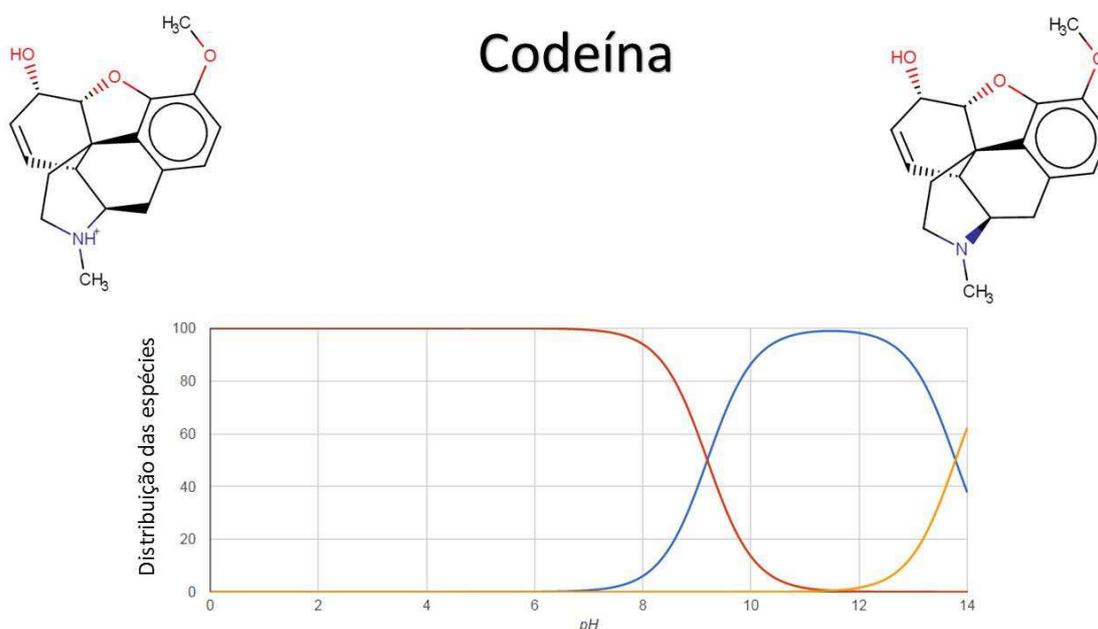
tratamento de dor moderada, tosse de causa não bacteriana, particularmente tosses prolongadas e dolorosas, como no caso de câncer de pulmão [19]. É um fármaco alcalóide do grupo dos opióides e, em grande parte, é utilizada com finalidades médicas sendo preparada através da metilação da morfina, sendo encontrada no ópio em baixas concentrações.

Menos potente que a morfina, utiliza-se COD em combinação com outros analgésicos da classe dos não opióides, como ácido acetilsalicílico ou paracetamol ou diclofenaco [20]. O uso deste fármaco pode gerar graves efeitos adversos como diarreia, náuseas, vômitos, obstipação intestinal, secura da boca, prurido, confusão, sedação e depressão respiratória. Além disso, a codeína pode criar vício e ser usada como droga de abuso, embora muito menos frequente do que com outros opióides. Após finalizar o tratamento, ao ser retirada abruptamente, a abstinência de codeína pode causar reações relativamente fortes no organismo, como dores abdominais seguidas de vômito e prisão de ventre [20].

A partir de um estudo feito na experimentação com ratos em laboratório [7], foi formulada uma curva de dose-resposta da combinação dos fármacos DCF e COD. Com o intuito de descobrir se a interação entre estas duas drogas é aditiva, sinérgica ou antagonica, foram estimadas curvas de dose-resposta de cada fármaco administrado individualmente, considerando-se que o efeito observado com a combinação resultava da soma dos efeitos individuais de cada componente [7]. O estudo demonstra que o efeito antinociceptivo da codeína é bem visto em casos de dor aguda e em hiperalgesia [21, 22].

COD é uma molécula que apresenta carga em uma extensa região de pH e, portanto, pode ser quantificada via eletroforese capilar. Conforme apresentado na Figura 7, a COD possui dois pKa's ($pK_{a1} = 9,2$ e $pK_{a2} = 13,8$). Na região de pH 9,2; a COD possui 50 % das moléculas carregadas positivamente e 50 % neutras. A medida em que se eleva ou diminui o pH do meio ($pK_a \pm 2$), o equilíbrio ácido-base é deslocado para formação de moléculas neutras ou carregadas positivamente, respectivamente. Quanto ao pKa 13,8 para esta molécula, em solução com pH de 14 contendo COD, esta apresentará 50 % das moléculas neutras e 50% carregadas negativamente.

Figura 7 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a codeína (COD).



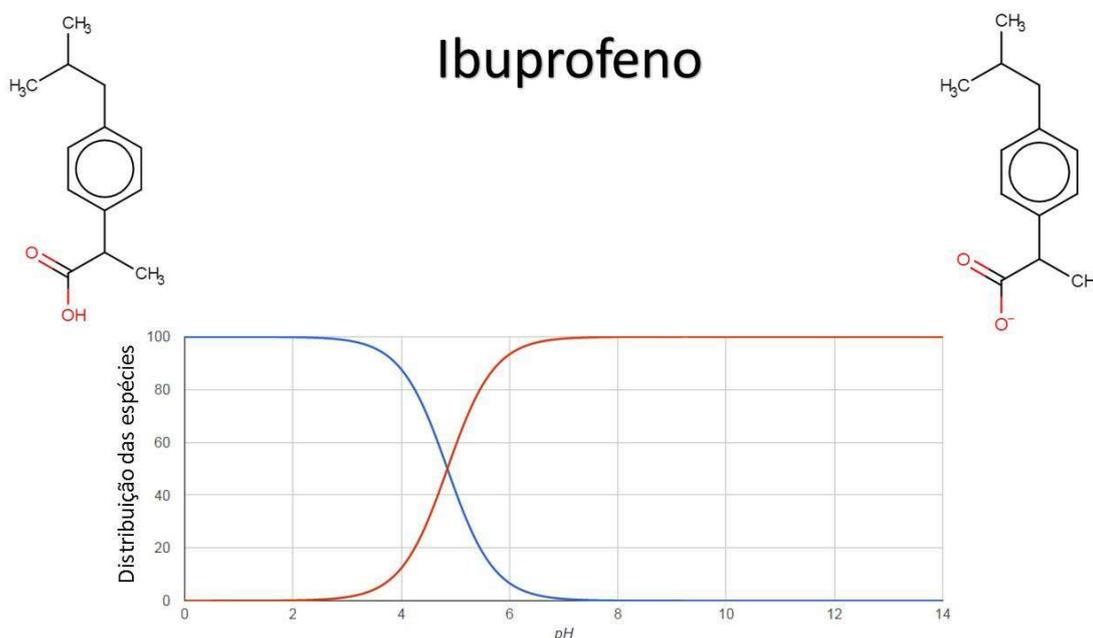
Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

IBU apresenta-se na forma isolada de pó cristalino, branco ou quase branco, possuindo odor característico. Possui baixa solubilidade em água, no entanto, facilmente solúvel em etanol, acetona, metanol e clorofórmio, ligeiramente solúvel em acetato de etila, sendo solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos e com faixa de fusão entre 75 °C e 78 °C [8].

O IBU ou (R,S)-ácido α -metil-4-(2-metilpropil)benzenoacético é um fármaco da classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que possui ação antipirética, analgésica e anti-inflamatória. Seu uso é muito comum, principalmente em pediatria, faz parte da lista de medicações essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e é o anti-inflamatório que menos provoca sangramento gastrointestinal [23]. O IBU também é indicado para alívio sintomático da dor de cabeça (cefaléia), dor muscular (mialgias), moléstias da menstruação (dismenorréia), febre e dor pós-cirúrgica, quadros inflamatórios, como em artrites, artrite reumatóide e artrite gotosa. Sua posologia para dor leve a moderada; febre; dor menstrual varia entre 200 a 800 mg a cada 4 ou 6 horas, sendo a dose máxima diária de 1200 mg [24].

Suas moléculas se comportam como um ácido fraco em solução, com um pKa de 4,8 e, portanto, em solução com pH neutro (≈ 7), 100% de suas moléculas já apresentam carga negativa (em forma de ânion), conforme pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a ibuprofeno (IBU).

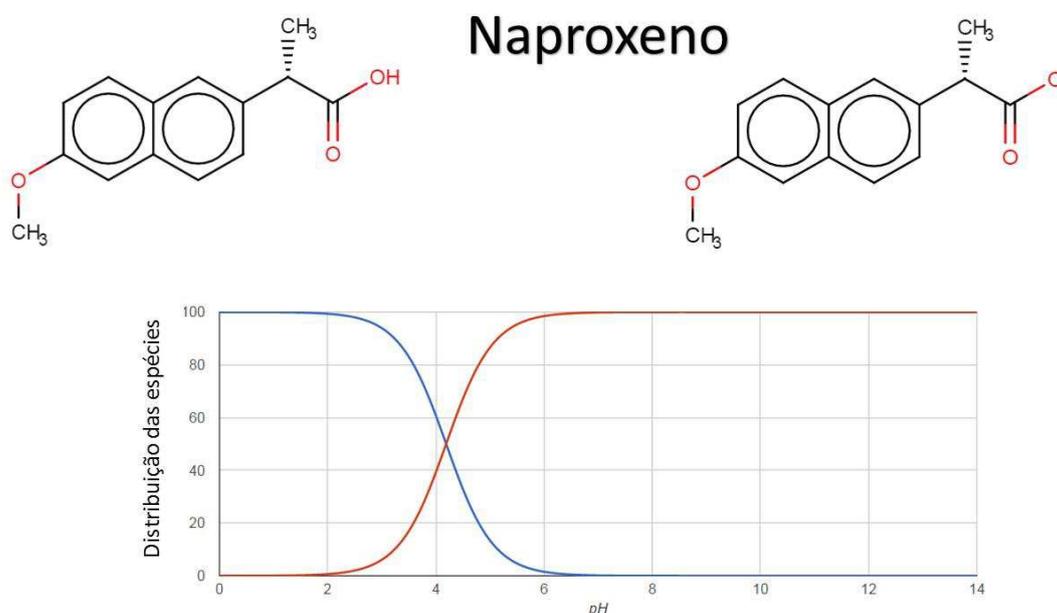


Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

NAP é comumente utilizado para tratamentos de inflamações e dores, principalmente em pacientes com reumatismo [25]. Ainda, devido às suas características, não eleva ou diminui os riscos de problemas cardiovasculares [26]. Não foi encontrada menção sobre NAP na Farmacopeia Brasileira, no entanto, a literatura aponta sua baixa solubilidade em soluções aquosas [27].

Assim como o IBU, as moléculas de NAP se comportam como ácido fraco em solução, possuindo um pKa de 4,2 e, portanto, em solução com pH 6, 100% de suas moléculas já apresentam carga negativa (em forma de ânion), conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a naproxeno (NAP).

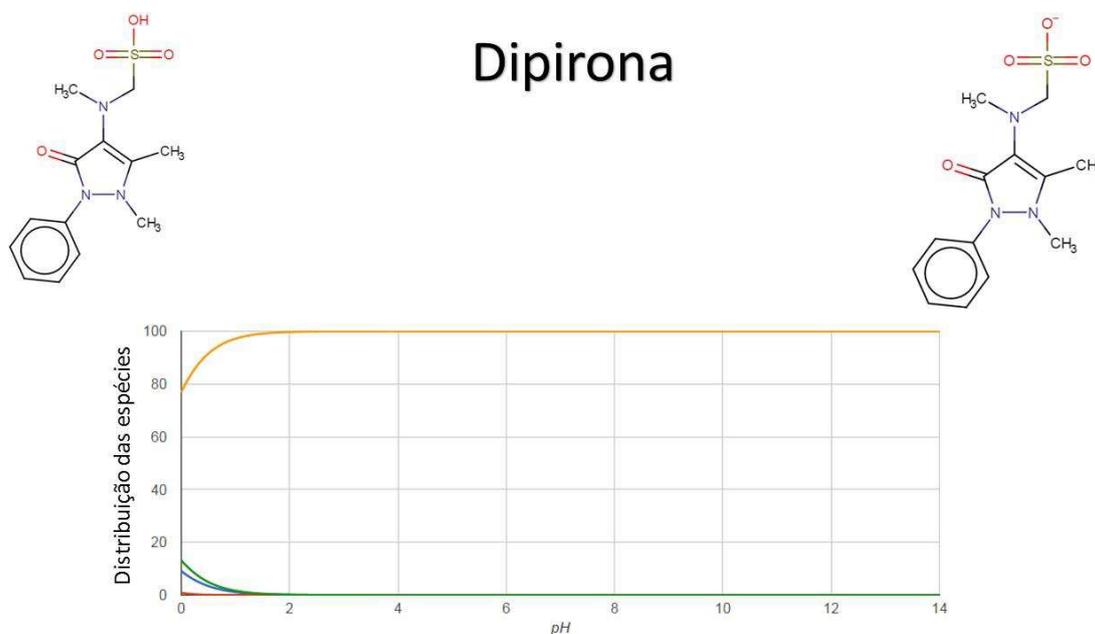


Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

A DIP é comumente encontrada na forma de sal de sódio (NaDIP), como pó cristalino, quase branco e inodoro. Solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter etílico, acetona, benzeno e clorofórmio[8].

DIP, também é conhecida como metamizole, é usada como analgésico e antipirético. Após ingestão, o princípio ativo conhecido como 4-metilaminoantipirina (4-MAA) é rapidamente gerado a partir da hidrólise da DIP, vindo a ser absorvido e biotransformado por reações enzimáticas, assim, devido a este comportamento, DIP é considerada um pró-fármaco [28, 29]. Apesar de ser consumida mundialmente, DIP teve seu uso restrito e até banido em alguns países devido aos riscos de reações adversas, principalmente agranulocitose [30, 31].

DIP se comporta como um ânion em toda faixa de pH aplicável em eletroforese capilar, possuindo um valor de pK_a de -1,4, como apresentado na Figura 10.

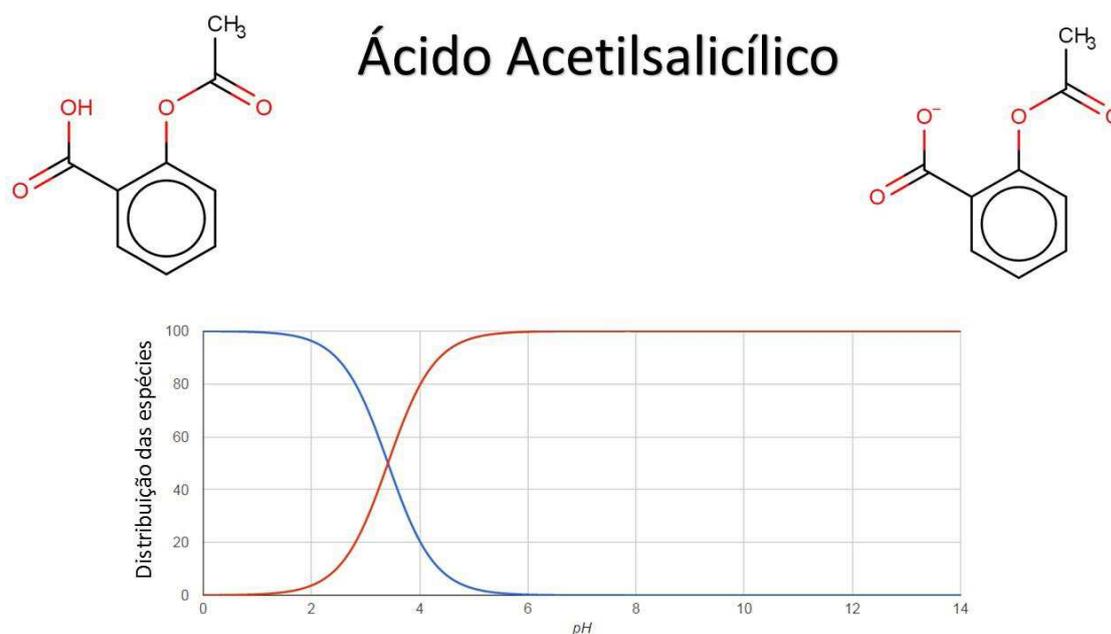
Figura 10 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a dipirona (DIP).

Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

Por sua vez, o AAS é encontrado geralmente na forma de pó cristalino branco ou cristais incolores, geralmente inodoro. De ponto de fusão em torno de 143 °C e pouco solúvel em água, muito solúvel em etanol, solúvel em éter etílico [8]. O AAS é vendido comercialmente pelo famoso nome de Aspirina como sendo um fármaco com propriedades analgésicas, antipiréticas, anti-inflamatórias e antiplaquetárias [32].

Uma solução que contenha AAS, possui suas moléculas em um equilíbrio ácido-base que resulta em um valor de pKa próximo de 3,4 e; portanto, como o próprio nome da molécula diz, a mesma se comporta como ácido. Em solução com pH acima de 6, 100% de suas moléculas apresentam carga negativa (em forma de ânion), conforme pode ser observado na Figura 11, a qual apresenta a distribuição das espécies de AAS em função do pH da solução.

Figura 11 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a ácido acetilsalicílico (AAS).

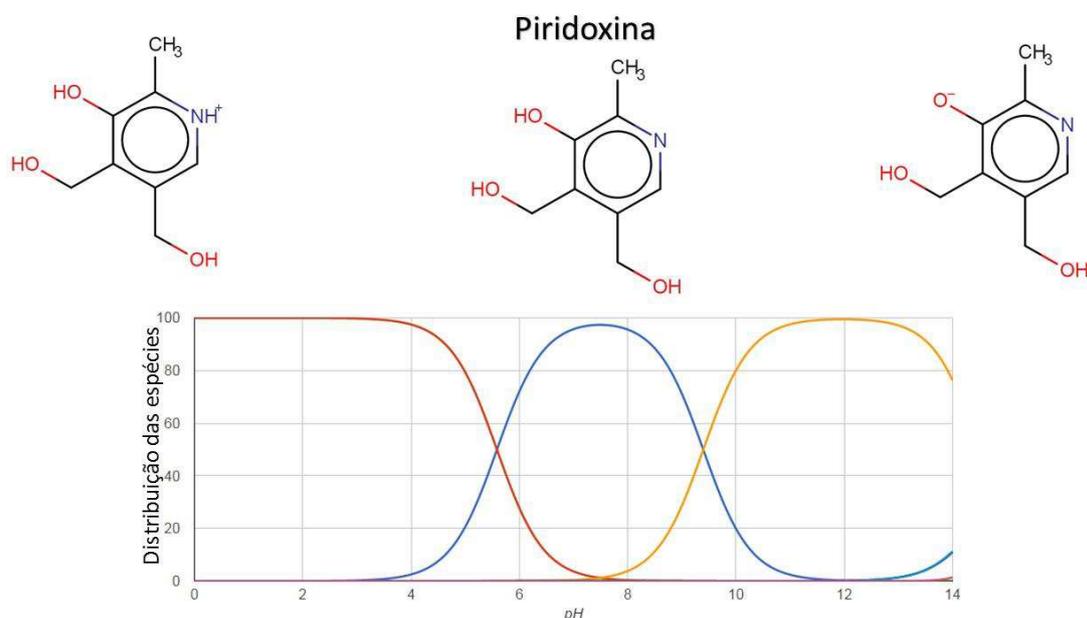


Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

A PIR é um pó cristalino, branco ou quase branco de ponto de fusão em torno de 205 °C, com decomposição. Facilmente solúvel em água, pouco solúvel em etanol, praticamente insolúvel em clorofórmio e éter etílico [8].

A PIR pertence ao grupo das vitaminas, conhecida como B6, sendo comumente encontrada em formulações contendo analgésicos ou estimulantes do sistema nervoso central (SNC) [33]. Devido à estrutura de sua molécula, a PIR possui características anfóteras, com dois valores de pKa 5,6 e 9,4. Em relação ao pKa 5,6; a PIR se comporta como uma base fraca, portanto, em solução com pH em torno de 6, cerca de 28% de suas moléculas apresentam, no equilíbrio ácido-base, carga positiva (em forma de cátion). Com o aumento do pH da solução, a porcentagem de moléculas na forma neutra (desprotonadas) vai se elevando e chega a 100 % em pH próximo 7,6, conforme pode ser observado na Figura 12. Se diminuirmos os valores de concentração hidrogênica da solução, resultando em elevação do pH da mesma, as moléculas de PIR tendem a deixar a forma neutra e perder um hidrogênio ionizável para assumir a forma aniônica no equilíbrio ácido-base. Essa dinâmica ocorre em pH próximo à 8,4; quando cerca de 10% de suas moléculas apresentam, no equilíbrio ácido-base, uma carga negativa (em forma de ânion). Aumentando ainda mais o valor do pH da solução, a porcentagem de moléculas na forma negativa atinge 100 % em pH próximo 11, conforme pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a piridoxina (PIR).

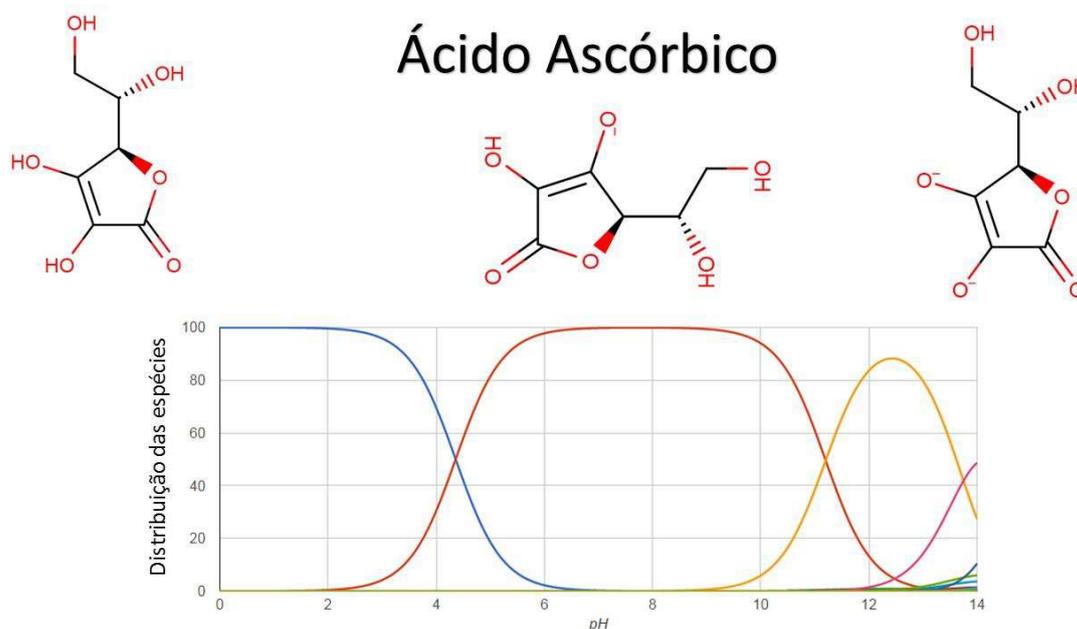


Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

O ASC (vitamina C) é encontrado isolado na forma de pó fino, cristalino branco, ou ligeiramente amarelado. No estado sólido é relativamente mais estável ao ar, mas em solução oxida-se rapidamente. Sua solução aquosa é límpida e de fácil solubilidade em água, sendo pouco solúvel em etanol e acetona, insolúvel em éter etílico, clorofórmio, éter de petróleo e benzeno. Apresenta faixa de fusão entre 189 °C e 192 °C, com decomposição [8].

O ASC possui moléculas que se comportam como ácido em solução, gerando valores de pKa's de 4,4; 11,2 e 13,7 e, portanto, em solução com pH neutro (≈ 7), o equilíbrio ácido-base está deslocado para que 100% de suas moléculas apresentem ao menos uma carga negativa (em forma de ânion), em pH 4,4; duas cargas negativas em pH 11,2 e sendo encontrado como ânion trivalente em pH 13,7; conforme pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a ácido ascórbico (ASC).



Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

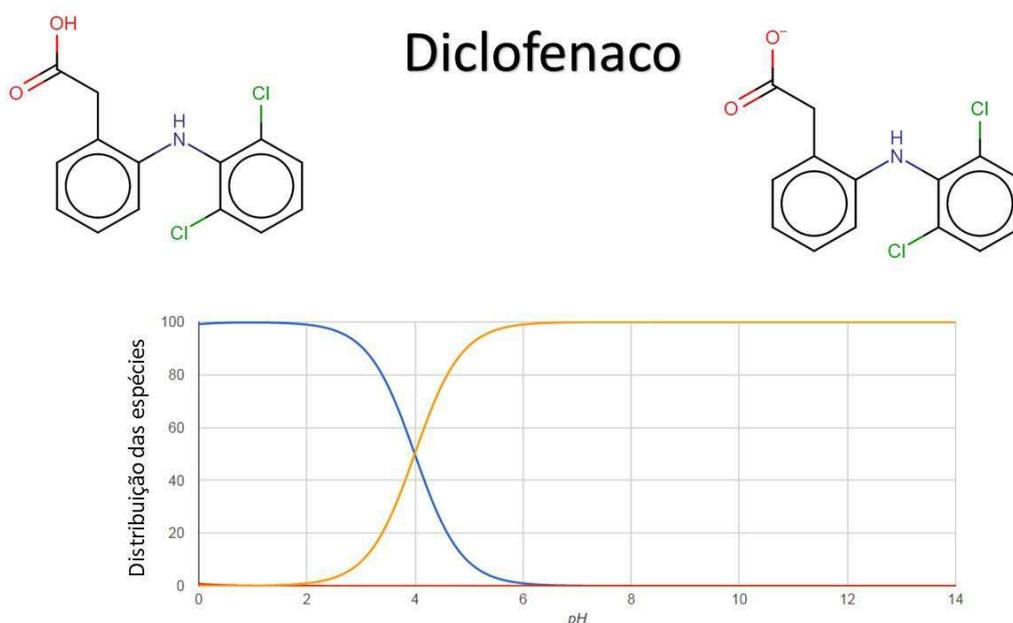
O DCF é encontrado isolado na forma de sólido em pó cristalino branco ou levemente amarelado, ligeiramente higroscópico. Pouco solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em etanol, muito pouco solúvel em acetona. Faixa de fusão: 295 °C a 300 °C, com decomposição [8].

O DCF pode ser encontrado em formulações farmacêuticas na forma de sal com três diferentes contra-íons: sódio, potássio ou dietilamônio. Sais de sódio e de potássio são indicados para administração oral e o sal de dietilamônio no tratamento tópico de processos inflamatórios [34, 35]. Apesar do diclofenaco de potássio (KDCF) e do diclofenaco de sódio (NaDCF) apresentarem o mesmo ingrediente ativo e serem fármacos de propriedades físico-químicas semelhantes, não são indicados no tratamento dos mesmos sintomas. O KDCF é ligeiramente mais solúvel em água do que NaDCF [36]. Portanto, o KDCF é rapidamente absorvido pelo organismo e tem eficácia analgésica mais rápida do que o NaDCF. Assim, o KDCF é indicado para tratar a dor aguda grave, enquanto o NaDCF é indicado no tratamento de doenças crônicas e prolongadas [37].

O DCF é um anti-inflamatório não-esteroidal utilizado mundialmente, sendo que também tem propriedades antipiréticas e analgésicas. A molécula possui um pKa próximo de 4 e, portanto, em solução com pH em torno de 3 (uma unidade menor que seu pKa), cerca de 10 % de suas moléculas já apresentam carga negativa (em forma de ânion).

Com o aumento do pH da solução, a porcentagem de moléculas na forma aniônica (desprotonadas) vai aumentando até 100 % em pH próximo 6, conforme pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a diclofenaco (DCF).

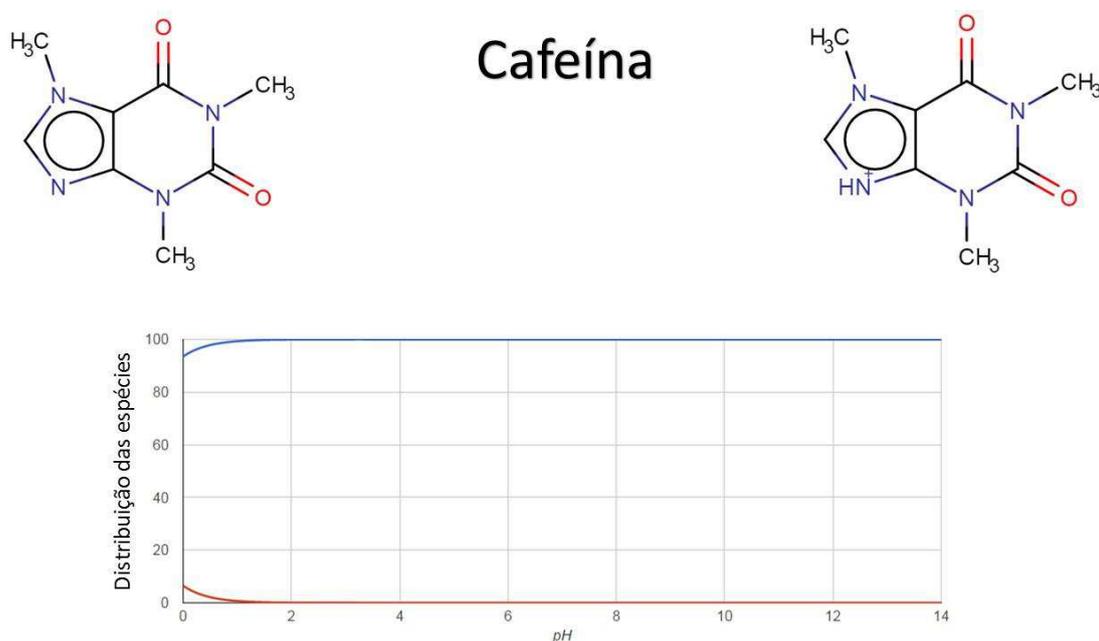


Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

A CAF encontra-se isolada na forma de pó branco ou cristais aciculares brancos e brilhantes, inodora e de sabor amargo, sublimada facilmente sob a ação do calor. A forma hidratada é fluorescente ao ar. Ligeiramente solúvel em água e etanol, facilmente solúvel em clorofórmio e pouco solúvel em éter etílico, possuindo faixa de fusão: 235 °C a 239 °C [8]. A CAF é o alcaloide mais utilizado mundialmente, distribuído em vários produtos naturais e ainda usado comumente em bebidas e em formulações medicamentosas. Possui distintos efeitos fisiológicos como o estímulo do sistema nervoso central (SNC) e é considerada diurética [38]. Apesar de não possuir atividades analgésicas, a CAF é encontrada facilmente em formulações com diferentes fármacos analgésicos devido às suas propriedades adjuvantes, aumentando em até 40% do efeito analgésico da droga principal [39]. Este fenômeno ocorre, provavelmente, devido ao efeito vaso constritor da CAF, o que reduz o calibre das veias do cérebro e assim, facilitando a absorção de drogas na corrente sanguínea [40].

Diferentemente de todas as outras moléculas apresentadas nesta tese de doutorado, a CAF não é ionizável, não possuindo equilíbrio químico do tipo ácido-base na faixa de pH aplicável em eletroforese capilar de zona (CZE), deste modo, para que se utilize a CZE na sua determinação, algumas modificações são requeridas, como por exemplo, o uso de compostos que, de algum modo, interajam e formem complexo carregados com a CAF [41, 42]. A distribuição das espécies de CAF em solução pelo valor do pH está apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Distribuição das espécies (em %) vs pH para a cafeína (CAF).



Fonte: Modificado de www.chemicalize.org [11].

CAF é encontrada na natureza, nas sementes de café, associada a ácidos clorogênicos, os quais são ésteres de ácidos trans-cinâmicos [43]. Este alcalóide é capaz de permear livremente através das membranas da parede celular e se acumular no interior das células pela formação de complexos com um dos ácidos clorogênicos [44].

Comumente o termo complexo é utilizado para descrever as interações entre um composto quelante e um metal [42]. No entanto, o complexo CAF-clorogenato foi descrito por Gorter [45] há mais de um século atrás. Como não existe um elemento metálico central neste tipo de complexo, ele é usualmente formado por interações de hidrogênio ou ainda hidrofóbicas. No início da década de 70, Hormanand e Viani [46], com base em estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), propuseram que os complexos do tipo CAF-clorogenatos deveriam ser descritos como complexos 1:1

interações hidrofobicamente π -molecular e, por sua vez, Martin e seus colaboradores [47] propuseram a geometria de interação deste complexo. Nesse sentido, com base nos os estudos, bem-sucedidos, realizados por Nogueira e do Lago [41] em formar o complexo aniônico de interações π entre a CAF e o DMX para determinação deste fármaco por CE, esta abordagem foi escolhida e utilizada neste trabalho para determinação de CAF.

Um resumo das propriedades físico-químicas das espécies estudadas neste trabalho está apresentado junto às suas fórmulas estruturais e outras informações nas Tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Estrutura molecular e outras características químicas de PAR, SCO, ORP, TRA, PRO, COD e IBU [11].

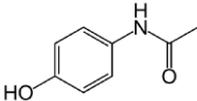
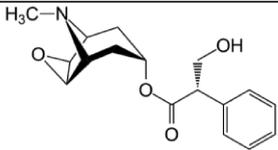
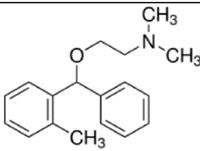
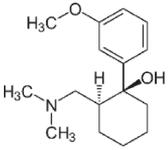
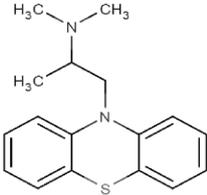
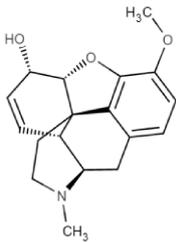
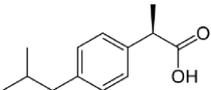
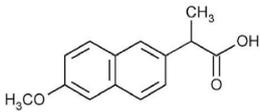
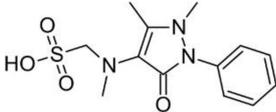
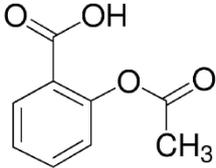
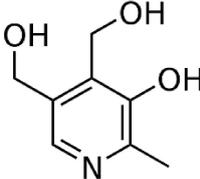
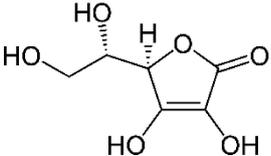
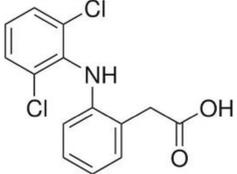
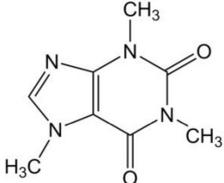
	Fórmula estrutural	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa
PAR		C ₈ H ₉ NO ₂	151,16	9,5
SCO		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,35	~10,2
ORP		C ₁₈ H ₂₃ NO	269,38	8,9
TRA		C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263,37	9,2
PRO		C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	284,42	9,1
COD		C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299,36	9,2
IBU		C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,28	4,8

Tabela 2 - Estrutura molecular e outras características químicas de NAP, DIP, AAS, PIR, ASC, DCF e CAF [11].

	Fórmula estrutural	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	pKa
NAP		C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,26	4,2
DIP		C ₁₃ H ₁₆ N ₃ NaO ₄ S	333,34	-1,4
AAS		C ₉ H ₈ O ₄	180,16	3,4
PIR		C ₈ H ₁₁ NO ₃	169,18	5,6 9,4
ASC		C ₆ H ₈ O ₆	176,12	4,4 11,6
DCF		C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	4,0
CAF		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	-0,9

1.2 Determinação de fármacos

Por ser um medicamento de fácil acesso, várias vezes associados à outras drogas lícitas ou fármacos, os quais podem ser utilizadas em casos patológicos extremos, e ainda terem poder de droga de abuso, a análise (controle de qualidade) de formulações farmacêuticas contendo PAR e outros princípios ativos é desejável.

É possível encontrar vários métodos, baseados em eletroforese capilar (CE), na literatura para determinação de PAR, seja deste princípio ativo isoladamente ou simultaneamente com outros fármacos/metabólitos, em distintas matrizes como amostras de fluídos biológicos bem como formulações farmacêuticas. PAR foi determinado na presença de seus principais metabólitos, em urina e soro sanguíneo, por CE com detecção por ultravioleta com rede de diodos (UV-DAD) acoplado à detecção de espectrometria de massas (MS) [48]. Ainda, CE com detecção com UV-DAD também foi utilizada com sucesso para determinação de PAR na presença de dextrometorfano, fenilefrina e clorfeniramina, em medicamentos [49]. Em formulações farmacêuticas, PAR foi determinado em conjunto com p-aminofenol, em um sistema CE com detecção amperométrica com eletrodo de trabalho de disco de carbono [50] e em um sistema de CE por microchip com eletrodo de trabalho de platina [51]. Também foi reportado na literatura a detecção indireta de PAR, em medicamentos, pelo uso de luminol no eletrólito de corrida (BGE) [52], com detecção UV [53], e na presença de cetirizina e fenilpropanolamina [54]. Ainda utilizando detecção UV, PAR foi determinado juntamente com CAF e propifenazona em amostras de medicamentos [55] com adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) ao BGE. O uso de SDS no BGE também foi utilizado com sucesso para determinar PAR e AAS em amostras de plasma humano [56]. A determinação de PAR também ocorre com outros métodos que não seja CE, como por exemplo, a determinação de resíduos de PAR e outros 8 fármacos, em amostras de água, por HPLC-MS [57]. Um resumo comparativo das características do método de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem condato (CE-C⁴D) utilizado neste trabalho e dos métodos baseados em CE para determinação de PAR encontrados na literatura é apresentado na Tabela 3.

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, os métodos para se determinar PAR são basicamente análise do espectro de absorção no infravermelho, absorção no ultravioleta (UV) e um método colorimétrico [8]. Já para ORP, COD e NAP não foram encontradas menções na Farmacopeia Brasileira. Por sua vez, TRA e IBU são

determinados por espectrofotometria de absorção no infravermelho e espectrofotometria de absorção no UV-vis. Para PRO, os métodos são basicamente absorção no infravermelho, um método colorimétrico e reações de identificação de fenotiazinas. No caso da SCO são basicamente absorção no infravermelho, um método colorimétrico e um cromatográfico, enquanto para DIP são relatados dois métodos colorimétricos. Para o AAS foram relatados análise por absorção no infravermelho, um método colorimétrico e dois métodos fundamentados em derivatizações. Para o DCF são apresentados os métodos empregando absorção no infravermelho, absorção no UV, cromatografia em camada delgada e um método colorimétrico. Para o ASC são relatados absorção no infravermelho e um método colorimétrico. PIR deve ser determinada por absorção no infravermelho, absorção no ultravioleta e um método cromatográfico. Por último, para determinar CAF é relatado absorção no infravermelho e dois métodos colorimétricos [8].

Tais fármacos vêm sendo utilizados há várias décadas e, por este motivo, vários métodos, bem como artigos de revisão são reportadas na literatura com informações sobre métodos de determinação de cada fármaco isoladamente. Portanto, seria difícil tentar citar todos os trabalhos de cada fármaco separadamente, desta forma, são citados nesta tese apenas alguns destes. Um ótimo exemplo deste fato é o caso do ASC, o qual é possível encontrar na literatura métodos de determinação, em produtos alimentícios, desde 1976 até 1981 [58], bem como de 1986 até 1992 [59], entre outros. Mais recentemente, para essa vitamina, encontramos referências sobre as vantagens da determinação de ASC por injeção em fluxo [60] bem como as vantagens e desvantagens do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de ASC e seu produto de degradação, o ácido dehidroascórbico [61] e ainda métodos eletroquímicos para determinação da vitamina C [62].

O mesmo exemplo pode ser aplicado ao AAS, sendo reportados na literatura métodos cromatográficos [63-66], espectrofotométricos [67-69] e eletroforéticos [70-73], entre outros. Como métodos para determinação apenas de PAR, em distintas matrizes com seus metabólitos, se destacam os métodos espectrofotométricos [74-82], cromatográficos [83-86], eletroquímicos [87-91] e CE [92-94]. Para DIP, temos também uma quantidade satisfatória de trabalhos com os mais distintos métodos [95-100].

Já para a determinação de DCF em amostras de medicamentos, entre as técnicas usadas para este fim, podemos destacar a espectrofotometria [101-105], cromatografia líquida [106-108], CE [109, 110], eletroquímica [111-114], espectroscopia Raman [115], fluorimetria [116, 117] e gravimetria [118]. Para COD, são encontrados

métodos cromatográficos para isolar a mesma de compostos como morfina e outros opiáceos [119, 120], e métodos eletroquímicos [121-123]. Enquanto para a SCO são reportados métodos cromatográficos e eletroquímicos [124-127].

Em menor quantidade temos métodos para determinação de drogas mais novas (quando comparadas, como por exemplo, com o AAS). São reportadas uma gama de métodos eletroquímicos para o NAP [128-134] e também método cromatográfico [135] e espectrofotométricos [136-138]. Métodos eletroquímicos para determinar simultaneamente NAP e PAR [139, 140]. Para a determinação de IBU alguns métodos cromatográficos e eletroquímicos [141-148], e também outros estudos para determinação simultânea de PAR e IBU [149, 150], bem como pra CAF e IBU [151] e CAF e PAR [152], e ainda, recentemente cinco métodos para determinação simultânea CAF, PAR e IBU sendo dois deles espectroscópicos com auxílio de quimiometria [149, 153], dois deles por HPLC [154, 155] e um por CE [154].

Em busca de acompanhar a evolução da indústria farmacêutica, bem como das técnicas e métodos analíticos no sentido de se aferir estes com melhor eficácia, é imperativo que ocorram desenvolvimentos de novos métodos de determinação simultânea de fármacos (economia de tempo e solventes). Neste âmbito, vários métodos para determinação simultânea dos compostos citados anteriormente com PAR são propostos na literatura.

Como exemplos para determinação simultânea de PAR e outros fármacos, temos a ocorrência de, PAR, CAF e DIP sendo analisados simultaneamente em 8 minutos por cromatografia [156] enquanto para PAR e DIP temos métodos eletroquímicos [157, 158]. Outros métodos cromatográficos são reportados para PAR, CAF, e AAS [159-164] bem como métodos eletroquímicos [165, 166]. Enquanto apenas para PAR e AAS temos métodos por espectrofotometria UV-vis [167]. Por sua vez, PIR é determinada simultaneamente com PAR em um método baseado em cromatografia que também determina AAS, CAF, COD e tiamina [168] Alguns trabalhos em eletroquímica reportam determinação simultânea de ASC e PAR [40, 169-176]. Podemos ainda destacar métodos para determinação simultânea de PAR e DCF [177-181].

No caso de trabalhos descrevendo a determinação simultânea de PAR e TRA temos tanto métodos cromatográficos [15, 182-184] quanto eletroquímicos [15, 183, 185, 186], e também um método espectrofotométrico com auxílio de quimiometria [187] e uma análise rápida (< 1 minuto) por CE-UV, utilizando uma solução de tetraborato de sódio como tampão de corrida em pH 9,8 [188]. Já para PAR e PRO, foram encontrados

métodos cromatográficos [189, 190] e espectrofotométricos [191, 192] na literatura. Da mesma forma, poucas ocorrências são encontradas na busca por determinação simultânea de ORP e PAR [14, 193-196]. Por último, temos alguns trabalhos com detecção eletroquímica [175, 197, 198], térmica [199], espectrofotométrica [200] e por CE [201]. Até a presente data, não existe trabalho publicado em que PAR e SCO são determinados simultaneamente, constantes nos mecanismos de busca das bases de dados dos portais de pesquisa “*Web of Science*”, “*PubMed*”, “*Scopus*” e “*Google scholar*”.

Como pode ser visto anteriormente, existem várias formulações contendo PAR e outros fármacos e deve-se atentar que, devido a existência de uma grande diferença na quantidade de PAR e cada um dos outros princípios ativos nas formulações comerciais, permanece o desafio de se realizar a determinação simultânea em uma única etapa. A relação de concentração comumente encontrada entre os princípios ativos PAR:SCO, PAR:TRA, PAR:PRO, PAR:COD e PAR:ORP é de 50:1; 9:1; 50:1; 17:1 e 13:1; respectivamente. Quantidades menores, em proporção, são observadas para PAR:IBU; PAR:NAP; PAR:DIP, PAR:AAS, PAR:PIR, PAR:ASC e PAR:DCF, sendo elas 1,6:1; 1,2:1; 1:1,5; 2:1, 5:1, 7:1 e 7,5:1, respectivamente. Ainda, geralmente para CAF a quantidade em massa é de 10 vezes menor do que a de PAR.

Apesar de vários métodos disponíveis na literatura, o uso de eletroforese capilar como uma alternativa para a determinação simultânea de PAR e outros princípios ativos em medicamentos é muito atrativa por ser mais rápida (tempos inferiores a dois minutos) e simples (preparo de amostras solúveis apenas por diluição em água) além de apresentar custo menor do que as outras técnicas citadas anteriormente (por exemplo, HPLC).

Tabela 3 - Comparação das características dos métodos baseados em CE para determinação de PAR. ^a($\mu\text{mol L}^{-1}$)

Método	BGE	Tempo	LOD ^a	Faixa linear ^a	Deteção	Matriz
[48]	50 mmol L ⁻¹ NH ₄ OH/acetato de amônio (pH 9,8)	4 min	Urina: 13,23 Soro: 3,31	49,6-992	UV-MS	PAR e metabólitos em urina e soro
[50]	12 mmol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ + 44 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ (pH=7,2)	150 s	1,4	5,0-1000	Amperometria	PAR e p-aminofenol em medicamentos
[52]	30 mmol L ⁻¹ Borato de sódio (pH 9,4)	6 min	0,56 x 10 ⁻³	0,66x 10 ⁻³ -66 x 10 ⁻³	Quimiluminescência	Medicamento e urina
[53]	40 mmol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ + 125 mmol L ⁻¹ lauril sulfato de sódio	11,7 min	-	-	UV	Medicamentos
[54]	10 mmol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9,0)	6,8 min	3,97	66,1-6615,4	UV	Medicamentos
[51]	20 mmol L ⁻¹ tampão acetato (pH 6,0)	35 s	5	10-500	Amperometria	PAR e p-aminofenol em medicamentos
[55]	20 mmol L ⁻¹ tampão borato + 30 mmol L ⁻¹ SDS (pH 9,0)	5,1 min	3,97	13,2 – 1323,1	UV	PAR e CAF em medicamentos
[56]	60 mmol L ⁻¹ tampão borato + 200 mmol L ⁻¹ SDS (pH 10,0)	11 min	-	-	UV	PAR e AAS em plasma humano
[49]	100 mmol L ⁻¹ tampão Na ₂ HPO ₄ (pH 8,0)	6,9 min	81,63	330,7 – 3969,2	UV-DAD	PAR e 3 fármacos em medicamentos
CE-C⁴D	20 mmol L ⁻¹ β-alanina + 4 mmol L ⁻¹ NaCl + NaOH (pH 9,6)	122 s	1,6	100-15000	C ⁴ D	PAR e 4 fármacos em medicamentos

Fonte: Autor (2017).

1.3 Breve histórico sobre eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) pode ser descrita como o fenômeno de movimentação de determinadas espécies, sejam moléculas ou átomos carregados, sob o efeito de um campo elétrico. O responsável por sua introdução foi Arne Tiselius, em 1937 [202]. Neste trabalho foi apresentada a separação, sob a ação de um campo elétrico, de uma mistura proteica em tubos contendo soluções tampão. Desde o início dos estudos e até hoje, esse tipo de abordagem de eletroforese em solução livre apresentou certas limitações na eficiência de separação causadas pelo aquecimento da solução proveniente do efeito Joule [203, 204]. A partir da sua introdução, a técnica de eletroforese foi utilizada em géis de agarose ou polímeros do tipo poliacrilamida, sendo chamadas de eletroforese em placas de gel (do inglês *slab gels electrophoresis*) e, apesar de usadas ainda hoje, e de serem consideradas de baixa eficiência e longos tempos de análise, são aplicadas à separação de macromoléculas como proteínas. Novamente, o efeito Joule pode ser a razão para a baixa eficiência na separação de espécies nesta modalidade de eletroforese.

O efeito Joule pode ser descrito como a elevação da temperatura causada pela passagem de uma corrente elétrica através de um material com baixa resistividade [204]. O calor produzido é proveniente do trabalho de se transportar as cargas através do material, por um período de tempo. A causa do aquecimento se deve pela colisão dos elétrons com os átomos do material de baixa resistividade, e nesses choques, a energia cinética (momento linear) passa para a estrutura do condutor aumentando a sua energia cinética (vibração) e por consequência gerando uma elevação da temperatura [203]. Depois de aproximadamente três décadas de sua introdução por Tiselius, outro pesquisador chamado Hjertén [205] propôs modificações na essência da técnica com intuito de melhorar a eficiência de separação. Neste trabalho, foi proposto um sistema em tubos abertos e giratórios para minimizar os efeitos de convecção. Tais tubos possuíam calibres muitas vezes superiores aos atuais, não sendo considerados como tubos capilares, pois os diâmetros internos eram da ordem de milímetros, enquanto atualmente essa escala está na ordem de micrômetros [206].

No final dos anos 1970, os estudos sobre eletroforese ganharam novamente força na tentativa de se desenvolver uma técnica de separação de alta eficiência. Tais estudos focaram tanto em aprimorar a instrumentação existente quanto em melhorar a

parte teórica da eletroforese, visando compreender os fenômenos envolvidos. O trabalho desenvolvido por Mikkers *et al.* [207] foi um dos que mais contribuiu para tal fato, pois descreveu os fenômenos causadores da eletrodispersão em bandas. No entanto, o maior avanço em direção à eletroforese capilar se deu nos estudos pioneiros realizados por Jorgenson e Lukacs [208, 209], que utilizaram capilares de sílica fundida com um diâmetro interno de 75 μm .

Ao se migrar de capilares com diâmetro interno da ordem de milímetros para a ordem de micrômetros foi possível minimizar o efeito Joule que afetava a eficiência desta técnica. Atualmente, o pequeno diâmetro interno dos capilares utilizados em CE, apresenta uma relação favorável entre o volume e a área superficial do capilar, o que favorece a dissipação de calor e permite a aplicação de campos elétricos mais elevados. Desta forma, diminui-se drasticamente os tempos de análise com o aumento da eficiência da separação. Apesar da notável evolução na técnica, tanto a eletroforese tradicional proposta por Tiselius, quanto à eletroforese capilar de zona (CZE) são fundamentadas no mesmo princípio de que espécies diferentes e carregadas, submetidas a um campo elétrico, migram de formas distintas umas das outras.

Com as evoluções e melhoras da técnica, a CE despertou interesse de vários grupos de pesquisa no mundo, elevando consideravelmente sua aplicabilidade, podendo ser utilizada na separação desde íons inorgânicos até macromoléculas, englobando deste modo, praticamente todas as áreas relacionadas às ciências naturais. Um dos atrativos que se destacam nesta técnica é o fato da instrumentação necessária ser relativamente simples, o que levou a muitos grupos a construírem seus próprios equipamentos, como é o caso do equipamento usado na realização do presente trabalho.

Além disto, outros fatores atrativos são os baixos custos do equipamento e da manutenção, por utilizar pequenos volumes de reagentes, principalmente se comparado com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Ainda, pode ser considerada muito versátil uma vez que com apenas um único capilar é possível separar classes de compostos completamente distintas, apenas trocando o eletrólito de corrida (BGE). E, talvez o mais atraente de todos os fatores, os tempos de análise em geral são bem reduzidos quando comparados com outras técnicas de separação.

No entanto, como qualquer outra técnica, a CE possui algumas limitações, como elevados limites de detecção (LOD) na ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol L^{-1} , quando

acoplada a detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D), não sendo capaz de analisar traços (sem etapas de pré-tratamento de amostras ou pré-concentração), e deste modo há uma limitação na variedade de matrizes nas quais esta técnica pode ser aplicada. E ainda uma dependência extrema com os valores de pH do BGE, que gera a necessidade de se possuir um tampão estável e com boa capacidade tamponante.

1.4 Teoria básica da eletroforese capilar

A técnica de CE se fundamenta quando uma espécie carregada (cátion ou ânion) é submetida a um campo elétrico, e desta forma tal espécie migrará pelo sistema capilar com uma velocidade (v_i) que é diretamente proporcional ao campo elétrico aplicado (E), como pode ser visto na Equação 1 [210].

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

Para CE, ao se dizer espécie carregada eletricamente não se deve pensar em apenas um único íon, mas sim em um conjunto de espécies, constituída de várias cargas, sejam elas positivas ou negativas, e também por moléculas neutras, todos participando do equilíbrio químico ácido-base dinâmico. A diferença de potencial aplicada que gera o campo elétrico (E) se distribui por todo o capilar e afeta todas espécies dentro deste. Como o equilíbrio é dinâmico, uma molécula que se encontrava neutra, se carregará, tornando-se um íon para em outrora voltar a ser neutra, e assim por diante. Desta forma, todo o grupo de moléculas daquela espécie (“plug” de amostra), regidos por uma constante de equilíbrio (Ka) migra, pelo interior do capilar durante a aplicação do campo elétrico. Quanto maior o somatório da carga das espécies, maior será a resposta ao campo elétrico aplicado. Essa resposta, chamada de mobilidade eletroforética, μ_{ep} , é governada ainda por outros fatores como: f (coeficiente de atrito - diretamente proporcional ao tamanho do íon e à viscosidade η do eletrólito de corrida), z (número de cargas elementares do íon) e e (carga elementar) (Equação 2) [211].

$$\mu_{ep} = \frac{z \times e}{f} \quad (2)$$

Ao se dizer que há uma proporcionalidade do somatório da carga das espécies não se deve considerar as cargas individuais (valências), mas sim na carga total das espécies que são regidas pelo equilíbrio dinâmico, sendo distribuídas de acordo com seu pKa (mais carregadas ou menos carregadas) em função do pH da solução. A carga (espécie monovalente) ou cargas (espécies bivalentes ou com mais valências) individuais de cada espécie também tem influência na mobilidade eletroforética pois determinam o tamanho do raio. No entanto, devemos destacar que, o raio que determinará o tamanho do íon será o raio hidratado (solvatado) e não o raio iônico, assim os equilíbrios que envolvem solvatação influenciarão a mobilidade eletroforética das espécies. Então, a Equação 2 pode ser reescrita na Equação 3.

$$\mu_{ep} = \frac{z \times e}{6\pi r \eta} \quad (3)$$

Por sua vez, a mobilidade eletrosmótica (μ_{eo} , Equação 4) é governada pela permitividade da solução, ϵ_r , pela permitividade do vácuo, ϵ_o , pelo potencial zeta, ζ , e pela a viscosidade dinâmica da solução, η . Com a aplicação de um potencial E , a velocidade eletrosmótica v_{eo} é dada pela Equação 5 [210].

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_r \times \epsilon_o \times \zeta}{\eta} \quad (4)$$

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E \quad (5)$$

Ainda, existe uma mobilidade que está relacionada à presença de carga, chamada mobilidade efetiva. As espécies existentes em equilíbrio, tanto no BGE quanto no “plug” de amostra, estarão com uma porção não ionizada (com mobilidade eletroforética zero por não possuir carga), e outra fração destas moléculas coexistirá com carga (com um valor específico e particular de mobilidade eletroforética). Então, a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de uma espécie nada mais é do que a somatória das mobilidades eletroforéticas de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos e suas frações molares (α), considerando a distribuição destas moléculas (Equação 6). De modo análogo à velocidade eletrosmótica, ao se aplicar um potencial E teremos a velocidade eletroforética efetiva v_{ef} da Equação 7 [210].

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \times \mu_j \quad (6)$$

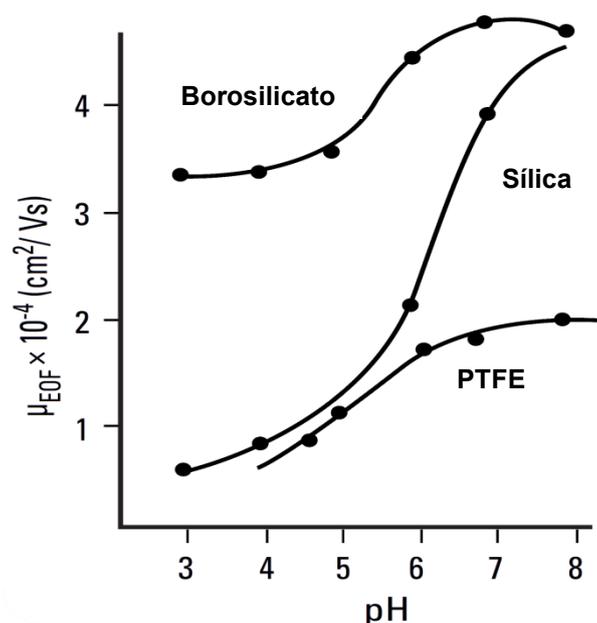
$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \quad (7)$$

Os conceitos de μ_{ef} e v_{ef} são de fundamental importância, pois a separação das espécies (resolução) com mobilidades eletroforéticas semelhantes é possível através da modificação dos valores da fração molar α pela escolha adequada do pH do BGE ou pela adição de determinado complexante ao mesmo, como por exemplo, no caso do uso de éter coroa para separar K^+ de NH_4^+ [212] ou ainda quando se usa o ácido 3,4 dimetoxicinâmico (DMX) para gerar um complexo carregado aniônicamente com a CAF [41]. Desta forma, através da manipulação de sua distribuição via pKa ou via constantes de estabilidade do complexo formado, é possível separar espécies com tempos de migração muito próximos.

Outro fenômeno que afeta intrinsecamente a migração de espécies em algumas modalidades de CE é o fluxo eletrosmótico (EOF). Tal fenômeno se manifesta quando há uma dupla camada elétrica formada entre a solução do eletrólito de corrida (BGE) e a parede interna da coluna capilar usada na separação [210]. Distintos materiais que são utilizados na fabricação destes capilares são capazes de formar tal dupla camada elétrica na sua superfície interna ao serem preenchidos com soluções com alguns parâmetros específicos, como elevados valores de pH para capilares de sílica e a presença de aditivos na composição do BGE, como cloreto de poli-(di-alil dimetil amônio) ou hexadecanosulfonatos para capilares de politetrafluoretileno (PTFE) [213, 214].

O EOF ocorre devido a certos parâmetros do meio que favorecem a adsorção de moléculas ou íons carregados ou principalmente da própria ionização da superfície do material que pode ser de sílica fundida, vidro de borosilicato ou ainda PTFE (Teflon®) [215]. Especificamente para capilares de sílica fundida, constituída por SiO_2 , material mais amplamente utilizado na fabricação dos capilares para CE, a formação da dupla camada elétrica ocorre pela presença de vários grupos silanóis residuais (SiOH) na superfície interna do capilar. Tais grupos se comportam como ácidos relativamente fracos (pKa~6) e, de acordo com pH do meio (BGE), estes grupos poderão estar totalmente desprotonados ou parcialmente/totalmente protonados [210, 215]. A Figura 16 mostra o efeito do pH sobre a mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.

Figura 16 - Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.



Fonte: Modificado de [210].

A ionização (desprotonação) dos grupos silanóis (considerado como ácido fraco) no interior do capilar de sílica fundida se inicia em $\text{pH} \geq 3$ e atinge seu máximo em $\text{pH} \geq 8$. Espécies constituintes do BGE que possuem cargas positivas tenderão a se aderir eletrostaticamente à parede do capilar com intuito de manter a eletroneutralidade do sistema, criando uma primeira dupla camada que é fortemente aderida à parede do capilar, e, mais distante, uma dupla camada difusa com uma interação mais fraca com a parede do capilar [215].

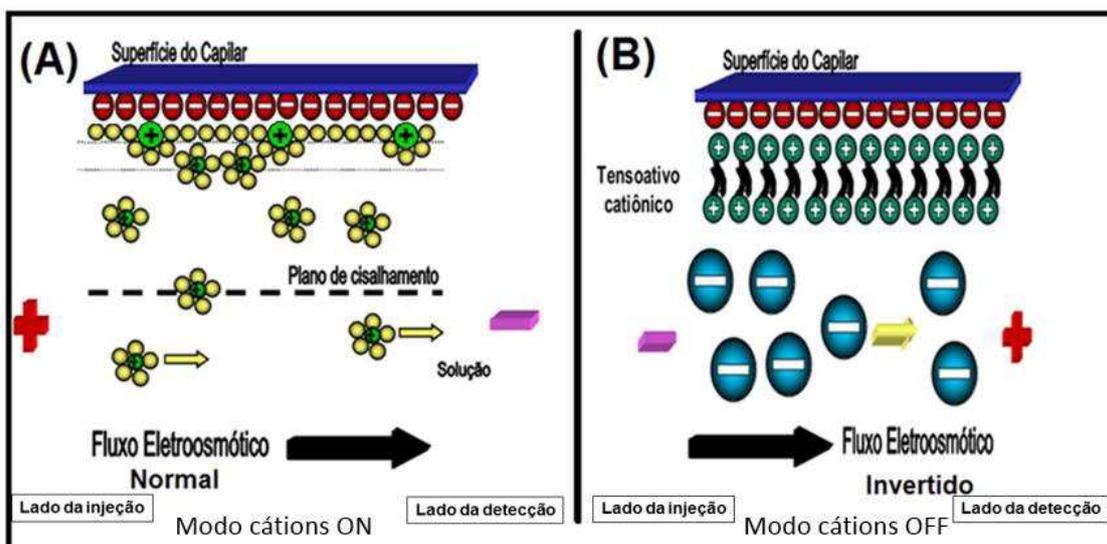
A aplicação de um potencial elétrico longitudinal (aliado ao diâmetro interno do capilar) desencadeia a migração dos íons que constituem o BGE envolvidos na formação da dupla camada elétrica, especificamente da dupla camada difusa, para os pólos de carga oposta, uma vez que os íons mais próximos da parede do capilar não migram. Este fenômeno é chamado de EOF normal e ocorre quando em capilares de sílica sem aditivos ou modificadores. Assim, ocorre uma migração líquida maior de cátions ($\mu_{ef} + \mu_{eof}$) em direção ao cátodo comparada a migração líquida de ânions ($\mu_{ef} - \mu_{eof}$) em direção ao ânodo.

Na determinação de ânions é comum inverter a direção do EOF para obter melhor resolução e aumentar a velocidade da análise. Quando o intuito é a determinação de ânions de elevada mobilidade eletroforética, como o Cl^- , a inversão do EOF é fundamental para que a análise (ânions podem ter velocidade similar ou até serem mais

rápidos que o EOF). Um dos métodos mais utilizados na inversão do EOF é a adição de surfactantes, geralmente tensoativos catiônicos, ao BGE. Os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês “*cetyltrimethylammonium bromide*”), apresentam propriedades que causam modificações na superfície interna do capilar e satisfaçam a inversão do EOF.

Enquanto o capilar sem modificação se encontra carregado negativamente ($\text{pH} > 3$), ao se adicionar um inversor (surfactante catiônico), uma camada fortemente ligada formada por semi-micelas é adsorvida na superfície interna do capilar, carregando esta parede interna com cargas positivas. Deste modo, contrariamente ao EOF normal, os ânions do tampão passam a fazer parte da dupla camada elétrica, e aqueles que compõem a porção da dupla camada difusa, sob a ação do campo elétrico, se movem em direção ao ânodo (pólo positivo). Outra modificação no sistema para se trabalhar com a inversão do EOF seria de se aplicar um campo elétrico, E , com sinal invertido (modo positivo) e assim, se faz possível o EOF invertido (Figura 17).

Figura 17 – Esquema ilustrativo da composição da superfície interna do capilar com EOF normal (A) e com EOF invertido (B).

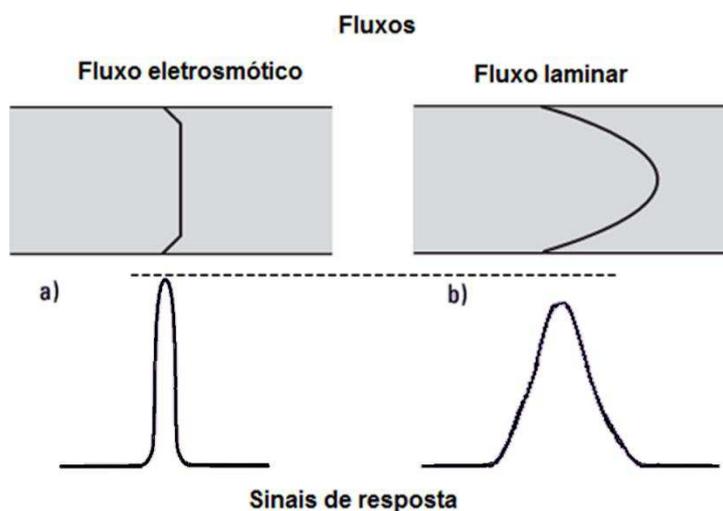


Fonte: Modificado de [216].

Por se tratar de um fluxo com perfil planar, o EOF proporciona ao sistema CE uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo. Em análises na presença de EOF, a mesma é livre do efeito de parede presente no fluxo laminar gerado quando se tem fluidos

impulsionados sob pressão através de uma tubulação, como análises por HPLC (Figura 18). Desta forma, o sistema CE com a existência de EOF possui uma característica positiva, pois pode proporcionar a esta técnica maior eficiência de separação quando comparado ao sistema CE sem EOF e até mesmo ao sistema HPLC.

Figura 18 - Perfis dos fluxos eletrosmótico (a) e laminar (b), e suas correspondentes zonas de amostras.



Fonte: Modificado de [210].

Caso a composição do conjunto BGE e capilar escolhidos para ser usada nos sistemas CE (tipo de capilar e pH do BGE) apresentem propriedades que possibilitem a existência do EOF, a migração das espécies não residirá apenas nas suas próprias mobilidades, pois a essas será somada ou subtraída a mobilidade do EOF. Assim, o tempo que as espécies levam para percorrer um determinado comprimento de capilar é determinado pela sua velocidade aparente (v_{ap}), como exposto na Equação 8, a qual corresponde a soma das suas velocidades efetivas (v_{ef}) e da velocidade do EOF (v_{EOF}). Similar a um vetor, o sinal da v_{EOF} é dependente da direção da mesma, adquirindo um sinal positivo caso tenha a mesma direção da v_{ef} , e negativo, caso seja em direção oposta. Considerando o EOF normal, 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.

$$v_{ap} = v_{ef} \pm v_{EOF} \quad (8)$$

Outras variáveis além do EOF, podem desempenhar efeitos positivos ou negativos no sistema CE. A Tabela 4 apresenta o efeito de algumas variáveis em cada caso.

Tabela 4 - Efeito de algumas variáveis no desempenho de um sistema de CE.

Variável	Efeito
Campo elétrico	Afeta proporcionalmente a v_{EOF} , eficiência, resolução, temperatura e, inversamente, o tempo de análise.
pH do BGE	Influencia diretamente na ionização da parede interna do capilar, e por sua vez, no potencial zeta (ζ), assim modificando a seletividade do sistema. Além de modificar a distribuição dos analitos de acordo com seus pKas.
Força iônica	Afeta inversamente o ζ e o EOF, pois promove a compressão da dupla camada elétrica. Ainda, afeta proporcionalmente a corrente do sistema, levando a maior presença do efeito Joule.
Temperatura	O descontrole promove variação de 2 a 3 % na viscosidade da solução podendo afetar o EOF e a repetibilidade do sistema.
Modificadores orgânicos	Afetam a viscosidade e o potencial zeta (ζ) podendo afetar a seletividade do sistema e geralmente diminuem o EOF. Dependendo de sua volatilidade podem causar bolhas no sistema quando da intensificação do efeito Joule.
Surfactantes	Através de interações iônicas e/ou hidrofóbicas, adsorvem na superfície interna do capilar. Surfactantes aniônicos podem intensificar o EOF, enquanto surfactantes catiônicos podem suprimir e/ou mesmo inverter o sentido do EOF.
Polímeros neutros hidrofílicos	Suprimem o EOF, já que aumentam a viscosidade e recobrem a superfície interna do capilar, podendo causar oclusão de suas cargas.
Ligações Covalentes	Modificar quimicamente a superfície interna do capilar afeta a estabilidade do sistema, podendo eliminar o EOF.

Fonte: Modificado de [210].

Uma das aplicabilidades da CE é determinar valores de pKa de analitos. Vários métodos são descritos na literatura e o procedimento de Fuguet E. *et al.* [217] é relativamente simples de ser implementado.

A base matemática do procedimento utilizado é que mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um ácido monoprótico pode ser expressada como função da sua constante

ácida (e, por conseguinte, pelo logaritmo desta constante ácida) e do pH do BGE (Equação 9) [217]:

$$\mu_{ef} = \frac{\mu_{A-}}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad (9)$$

Esta equação pode ser rearranjada para se obter a Equação 10:

$$pKa = pH + \log \frac{\mu_{A-} - \mu_{ef}}{\mu_{ef}} \quad (10)$$

Tais valores de mobilidade são calculados diretamente a partir dos tempos de migração do analito (t_m) e o tempo de migração do sinal do EOF (t_0) pela Equação 11:

$$\mu = \frac{L_T L_D}{E} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (11)$$

Em que: L_T e L_D são respectivamente os comprimentos total e efetivo do capilar (cm), E é o potencial aplicado (kV), t_m é o tempo de migração do analito (s) e t_0 o tempo de migração do EOF (s).

Quando um padrão interno (PI) é utilizado, duas equações são obtidas a partir da Equação 10, uma para a espécie de pKa desconhecido (pKa_D) e outra para o PI. Se uma for subtraída da outra e rearranjada, temos a seguinte expressão, apresentada na Equação 12, não dependente do pH:

$$pKa_D = pKa_{PI} + \log \left(\frac{\mu_{A-D} - \mu_{ef D}}{\mu_{ef D}} \right) - \log \left(\frac{\mu_{A-PI} - \mu_{ef PI}}{\mu_{ef PI}} \right) \quad (12)$$

Para esta Equação 12 são necessárias apenas as medidas de mobilidade efetiva (μ_{ef}) e mobilidade limite (μ_{A-}). Estes valores podem ser obtidos pela injeção de uma solução contendo ambos os compostos em um sistema CE com BGE com valor de pH no qual ambos os compostos estão completamente ionizados (mobilidade limite, μ_{A-}) e, em seguida, injetados em um BGE com valor de pH no qual estão apenas parcialmente ionizados (mobilidade efetiva, μ_{ef}).

1.5 Modalidades eletroforéticas de análise

Dentre as modalidades de separação existentes em CE, a eletroforese capilar de zona (CZE, “*capillary zone electrophoresis*”) é uma das mais utilizadas devido a sua simplicidade, no entanto, justamente devido a essa característica, este modo de separação não permite certas análises ou separações, como por exemplo de espécies com valores de pKa muito próximo. Devido a este fato, pequenas modificações são propostas baseadas em CE para que se tenha maior versatilidade e assim superar tais limitações. As variações propostas para CZE, tem como finalidade, por exemplo, aumentar a eficiência na separação, sendo algumas vezes superiores à CZE tradicional e outras técnicas ou até mesmo exclusivas de cada modalidade. Dentre as modificações, temos a cromatografia eletrocínética micelar (MEKC, “*micellar electrokinetic chromatography*”), eletroforese capilar em gel (CGE, “*capillary gel electrophoresis*”), eletrocromatografia capilar (CEC, “*capillary electrochromatography*”), isotacoforese (CITP, “*capillary isotachopheresis*”), focalização isoelétrica (CIEF, “*capillary isoelectric focusing*”) e eletroforese capilar de afinidade (ACE, “*affinity capillary electrophoresis*”).

1.5.1 Eletroforese capilar de zona (CZE)

Dentre os modos de separação desenvolvidos ao longo dos anos em CE, a CZE (também conhecida como eletroforese capilar em solução livre) pode ser considerada como sendo a mais simplória e, ao mesmo tempo, a mais amplamente aplicada, justamente devido à facilidade de sua implementação e de otimização dos parâmetros experimentais. A modalidade de CZE tem fundamento apenas nas diferenças entre as mobilidades eletroforéticas de espécies carregadas (cátions ou ânions). Geralmente, sua implementação é realizada em BGEs aquosos ou orgânicos, podendo ainda ser misturados à complexantes, alterando as mobilidades dos analitos pela interação direta [211, 218].

1.5.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

Em busca de melhor eficiência, Terabe e seu grupo iniciaram os estudos que culminaram na fundamentação da MEKC em 1984 [219], focando a separação de analitos neutros com uso de agentes tensoativos iônicos, como o dodecilsulfato de sódio (SDS). Tal reagente é normalmente utilizado como detergente pela capacidade na formação de micelas e ao ser adicionado ao BGE, proporciona a formação de um sistema cromatográfico de duas fases (o BGE e as micelas). Desta forma, o BGE migra pela ação do campo elétrico, enquanto as micelas, por sua vez, são transportadas pela combinação entre o campo elétrico e a eletrosmose. Assim, devido a existência de duas fases distintas, a separação dos analitos sem cargas ocorre devido à diferença dos coeficientes de partição entre a fase do BGE e a fase das micelas [218]. A MEKC é um caso específico da cromatografia eletrocinética (EKC), na qual ou os analitos ou a fase dispersa devem possuir carga, e neste caso a fase dispersa no capilar é a fase micelar [211]. Ainda podendo existir a modalidade de cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEECK), a qual nada mais é do que um caso especial da MECK, na qual uma microemulsão é empregada como fase dispersa [211].

1.5.3 Eletroforese capilar em gel (CGE)

Esta modalidade de CE é fruto da adaptação da eletroforese clássica em placas de gel para capilares, obtendo como vantagem resultados quantitativos com melhor exatidão e precisão. Ainda, devido à possibilidade de automação do processo se tem como vantagem um aumento da frequência das análises. A técnica CGE é muito aplicada especialmente na separação de DNA. Essa modalidade de eletroforese pode ser considerada como um caso especial da eletroforese capilar de peneiramento (CSE), a qual se baseia em se utilizar um meio peneirador como, por exemplo, uma rede de polímeros lineares e emaranhados [211]. Neste modo de separação, um gel contendo ligações cruzadas é utilizado para preencher o interior do capilar, ocorrendo a separação dos analitos pela diferença nos tamanhos relativos destes situados na matriz polimérica do gel [218].

1.5.4 Eletrocromatografia capilar (CEC)

A CEC pode ser considerada como simplesmente a união da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a CE. Similarmente à CGE, nesta técnica os capilares são recheados parcialmente, no entanto, em CEC, no lugar dos géis existe uma fase estacionária como por exemplo, C18. A diferença chave reside no transporte da fase móvel, que neste caso não ocorre devido a pressão das bombas utilizadas em HPLC, mas através do EOF [220]. Essa modificação, apesar de parecer sutil, causa uma diferença no sistema de forma que se reduz o efeito parede causado pela pressão (fluxo laminar), uma vez que o tempo de análise fica determinado pela combinação da migração eletroforética e da retenção cromatográfica [211].

1.5.5 Isotacoforese capilar (CITP)

Para aplicar a CITP, se faz necessário empregar dois tipos de eletrólitos de corrida e os solutos ficam confinados entre as regiões compostas pelas discontinuidades das soluções eletrolíticas [211]. Para que a CITP funcione, um dos dois BGEs é chamado de eletrólito líder por apresentar mobilidade eletroforética maior que todos os componentes da amostra, enquanto o outro, eletrólito terminador, apresenta mobilidade eletroforética menor que todos os componentes do analito. Em outras palavras, as condições necessárias para que os analitos migrem nas zonas adjacentes destas discontinuidades são que as mobilidades dos íons que compõem o eletrólito líder e terminador sejam obrigatoriamente maior e menor, respectivamente, que as mobilidades dos íons analitos que compõem a amostra [211]. Após a aplicação do campo elétrico temos a migração dos analitos em ordem decrescente de mobilidade, mas com velocidade constante e única. Quando o campo elétrico é aplicado, diferentes gradientes de potencial evoluem cada banda de tal forma que todos os solutos eventualmente migram proporcionalmente com velocidades idênticas. Em regiões onde cátions de menor mobilidade estão presentes, o campo elétrico é mais intenso, do mesmo modo que em regiões de cátions com maior mobilidade o campo elétrico é mais fraco, assim resultando em uma velocidade individual normalizada [218].

1.5.6 Focalização isoelétrica capilar (CIEF)

Essa é a técnica eletroforética que permite a separação de espécies que possuem na sua estrutura cargas opostas simultâneas que podem deixá-la neutra (espécies anfóteras), uma vez que ela é capaz de realizar a separação destas espécies quando se tem um gradiente de pH gerado no interior do capilar, de acordo com os pontos isoelétricos (pI) dos analitos [211]. Ao se atingir o pH no valor do pI da espécie, esta fica neutra e sua migração é interrompida, mas ao entrar em pH diferente do seu pI, a mesma adquire carga e volta a migrar. A protonação e/ou desprotonação destas espécies é responsável pela variação da carga efetiva da molécula em função do pH e, deste modo, o gradiente de pH fica responsável pela mobilidade eletroforética das espécies [218].

1.5.7 Eletroforese capilar de afinidade (ACE)

A ACE, também conhecida como CAE (*capillary affinity electrophoresis*) é uma técnica de separação em capilares baseada na adição ao BGE de substâncias que interagem com um elevado nível de especificidade, geralmente bio-especificamente, com os analitos [211]. Essa modalidade é amplamente utilizada em estudos com intuito de se determinar as constantes de afinidade ou associação (*binding*), as quais são geradas nos processos de interação biomolecular [221].

1.6 Detectores em CE

A escolha do sistema de detecção para se aplicar em CE é de fundamental importância, uma vez que seria contraditório se ter um detector limitado que não complementasse a técnica de separação de elevado desempenho. Idealmente, o sistema de detecção escolhido deve contemplar alguns quesitos como, por exemplo, ser o mais seletivo possível aos analitos em questão bem como possuir maior detectabilidade aos mesmos. Um detector será seletivo ao analisar espécies com propriedades físico-químicas semelhantes, sendo interessante a escolha desta seletividade em análises e que não seja possível obter boa resolução entre as espécies em estudo. Deste modo, poderia ser ignorado o fato de existir uma co-migração entre a espécie de interesse e outras espécies que não são detectáveis no sistema utilizado. Todos detectores apresentam vantagens e desvantagens, dependendo da sua aplicação, e nenhum deles é perfeito e aplicável para

todas as amostras complexas que existem, deste modo é imperativo uma, a escolha mais adequada possível, que supra a necessidade do analista, para cada situação específica.

Em se tratando das técnicas analíticas de separação, apesar de não poder ser ignorada, a seletividade do detector possui um papel menos relevante do que a detectabilidade, uma vez que a responsabilidade pela obtenção de seletividade na análise fica a cargo da separação, por isso a importância de se ter uma boa resolução. A Tabela 5 expõe alguns valores típicos de limites de detecção (LOD) de alguns dos detectores que podem ser aplicados em CE.

Tabela 5 - Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.

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

Fonte: Modificado de [222] e [12].

Como já citado, não existe nenhum método de detecção é livre de falhas e perfeito à qualquer situação, desta forma algumas considerações podem ser feitas. Os métodos de detecção baseados em fluorimetria, apesar de apresentarem os menores

valores de LOD, geralmente carecem de derivatizações dos componentes previamente à análise, o que acarreta no acréscimo de mais uma etapa de preparo de amostras e possível agregação de erros, além de ser considerado um detector de valor econômico elevado tanto para aquisição quanto para manutenção [223]. Uma maneira de se esquivar da derivatização é possível pela adição de uma substância fluorescente ao BGE, realizando assim uma detecção indireta, porém, a sensibilidade nestes casos geralmente pode ser menor. Já no caso de detecção eletroquímica, mais especificamente a amperométrica, apresenta-se com boa sensibilidade e possui uma boa seletividade, principalmente ao se utilizar a modalidade de amperometria de múltiplos pulsos com a estratégia apropriada [224]. No entanto, uma das limitações mais graves da aplicação deste tipo de detector ao sistema CE é a dificuldade no seu posicionamento (adaptação e distanciamento) para que não haja interferência mútua entre o potencial aplicado para gerar o campo elétrico (usado na separação em CE) e a corrente detectada no eletrodo de trabalho [225-228].

Por sua vez, a espectrometria de massas (MS) pode ser considerada como outro tipo de detecção de alta aplicabilidade que pode ser empregado em CE. Esta técnica além de apresentar uma boa sensibilidade à vários tipos de compostos, possui a vantagem de gerar informações estruturais adicionais, muitas vezes importantes ao se realizar análise de produtos de degradação e metabólitos [229]. No entanto, o BGE deve possuir características específicas, as quais geralmente causam dificuldade e fazem com que se tenha limitações em função do pH para trabalhar [230, 231]. Além da necessidade de se ter um BGE volátil (como o tampão composto por ácido carbônico e amônia) e essencialmente puro para esse tipo de detecção, que limitam a gama de componentes do BGE. Outro obstáculo reside no fato de certas moléculas não poderem ser eficazmente ionizadas na fonte de ionização, não gerando deste modo sinal analítico detectável [232].

A absorção por UV-vis pode ser considerada a modalidade de detector mais amplamente aplicada em sistemas CE [233]. Sua seletividade baseia-se na fácil escolha de um comprimento de onda, no qual os analitos de interesse apresentam absorvidade ou ainda, de forma universal e indireta, uma radiação UV na qual um cromóforo presente no BGE é constantemente monitorado e analitos que não interagem com essa luz podem vir a ser detectados. É comum o emprego, neste caso, de uma célula do tipo “Z”, tipo “U” ou tipo bolha [234], uma vez que causa um aumento da sensibilidade por aumentar o caminho ótico do sistema, ou ainda, realiza-se a remoção do revestimento de poliimida do capilar de sílica fundida para permitir a passagem de radiação [231]. Uma limitação

que pode ser mencionada em relação à este tipo de detector ocorre ao se tentar analisar espécies não sensíveis aos detectores UV-vis, principalmente para alguns cátions metálicos presentes como co-íons em medicamentos, uma vez que a grande parte destes não apresenta absorção na região do espectro UV-vis. Além disso, o uso da detecção indireta apresenta limitações em função do pH, necessário devido ao uso do cromóforo, o qual poderia acarretar a precipitação destes metais, [235], e por último, por seguir a Lei de Beer-Lambert, a detecção fica também atrelada às limitações desta lei [12].

Outra ressalva que deve ser feita é a forma de obtenção do valor do LOD independentemente do tipo de detector selecionado para o sistema CE. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [236], o LOD pode ser definido, pela tradução livre, a concentração ou quantidade derivada da menor medida que pode ser detectada com uma certeza apropriada por um determinado procedimento analítico, dependendo da média das medidas do branco, do desvio padrão das medidas do branco e de um fator numérico escolhido de acordo com o nível de confiança desejado [236]. Geralmente este fator numérico é de 3 para LOD e de 10 para limites de quantificação inferiores, para um grau de confiança de 97,5%.

Em outras palavras, o LOD seria a quantidade mínima, em concentração, de um analito que produza um sinal analítico de três vezes o sinal da ausência total de analitos (branco). Ou seja, a concentração mais baixa possível em que o analitos conseguem ser distinguidos do ruído do branco com confiança, e na qual a sua detecção é praticável.

Normalmente, muitos LOD são estimados por medidas em replicatas, normalmente $n=10$, de uma calibração utilizando como o sinal analítico do ruído ou de um branco de amostra. Assim, o LOD pode ser avaliado com base em parâmetros matemáticos pela triplicata do quociente entre o desvio padrão do branco e pela inclinação da curva analítica, representados pela equação $(3SB/b)$, na qual, SB é o desvio padrão das 10 medidas do branco, e o b é a inclinação (sensibilidade) da curva analítica. Uma crítica a este modo de se obter o LOD é fundamentada na falta de evidência objetiva que prove que aquela concentração resultante do cálculo irá realmente gerar um sinal analítico no sistema, que seja distinguível do branco. Para as medidas espectrofotométricas tal cálculo gera valores aceitáveis e compatíveis com a realidade do LOD, no entanto, geralmente no caso da cromatografia com detecção UV/DAD, essa medida subestima o LOD, enquanto

no caso de CE-C⁴D, os valores calculados por este método superestimam o LOD [237]. Os trabalhos encontrados na literatura e referenciados na Tabela 3 tiveram essa abordagem para estimar o valor de LOD dos métodos propostos.

Uma outra abordagem para se determinar o LOD é via empírica, a qual consiste em medir progressivamente soluções de concentração cada vez mais diluídas até que não se encontre diferenças fidedignas do ruído [238, 239]. A vantagem dessa abordagem empírica é que existem dados objetivos utilizados para comparar as respostas analíticas provenientes das baixas concentrações dos padrões, e determinar, conclusivamente, quais valores de concentração de analito são necessários para se distinguir do branco e dizer se há ou não presença do analito.

1.6.1 Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D)

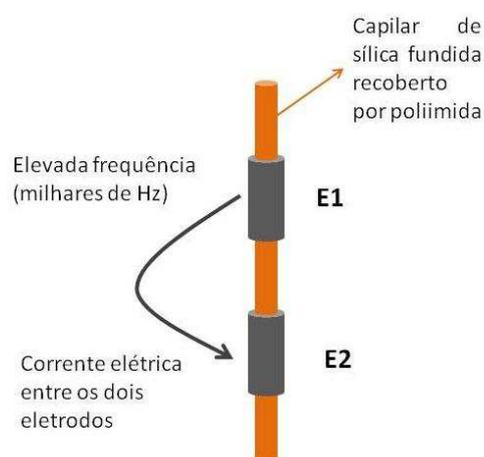
Uma modalidade de detectores aplicáveis em CE são os baseados em detecção condutométrica. Sendo que os detectores condutométricos convencionais (com contato), geralmente acarretam adaptações complexas no capilar, como a necessidade de se realizar perfurações do capilar com laser de CO₂ para posicionar os dois eletrodos que compõem o detector [240]. Essa adaptação além de ser uma manobra de difícil performance, gera contato entre o eletrodo do detector convencional e a solução, e desta forma, podendo causar bolhas no sistema provenientes da eletrólise da solução, ou ainda contaminações pelos produtos desta eletrólise. Uma alternativa dentro desta modalidade de detecção é a utilização de detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D, do inglês “*capacitively coupled contactless conductivity detection*”). Zemann e colaboradores [231] e Fracassi da Silva e do Lago [241] foram pioneiros nesse tipo de detecção.

Os detectores C⁴D apresentam uma alternativa interessante, uma vez que o posicionamento do capilar no detector se tornou mais simples e rápido, quando comparado com a tarefa morosa de se furar o mesmo com gás carbônico. A simplicidade de tal procedimento baseia-se apenas na inserção do capilar entre dois cilindros metálicos que são usados como eletrodos oscilométricos neste detector. Além disto, devido ao fato de não haver contato entre os eletrodos do detector e a solução do BGE, elimina-se o risco de contaminação previamente citado, diminui-se a interferência do campo elétrico usado

na separação das espécies (analogamente ao problema com detecção eletroquímica), garantindo uma melhor estabilidade (sem bolhas) e resposta analítica (maior razão sinal/ruído) [242, 243]. Devido ao exposto, a detecção condutométrica sem contato (C^4D) ganhou espaço rapidamente como forma de detecção em sistemas de CE [244-246], com detecção próximas à análises em tempo real [247] e até mesmo em sistemas com o conceito portabilidade da eletroforese por microchip [248, 249].

Na sua essência, a detecção por C^4D , um sinal senoidal de elevada frequência (na ordem de MHz) é aplicado, em um dos dois eletrodos existentes no detector, enquanto uma corrente elétrica é detectada no outro eletrodo (apesar de não haver contato entre os mesmos). A corrente elétrica induzida é detectada entre os eletrodos do detector é proporcional à condutividade da solução que irá fluir no interior do capilar e entre tal espaço delimitado entre os dois eletrodos. Essa corrente é convertida em tensão alternada, com posteriores etapas de retificação e amplificação, e através de uma placa conversora analógico-digital gera um registro que pode ser interpretado e trabalhado através de softwares. Um esquema deste funcionamento está representado na Figura 19.

Figura 19 - Esquema do sistema de detecção C^4D , onde E_1 e E_2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.



Fonte: Autor (2017).

O funcionamento adequado do detector depende muito do valor da frequência aplicada, pois variando este valor, a resistência da solução no interior do capilar deixa de ser detectada e o C^4D não cumpre o papel de notar variações na condutância. Portanto, uma frequência ótima de trabalho deve ser aplicada, na qual a resistência da solução é

relevante e pode ser determinada através da corrente que flui entre os eletrodos [240, 242, 243]. Geralmente, existem moduladores para que seja possível otimizar a frequência aplicada nos eletrodos, no entanto, na versão deste detector utilizada neste trabalho teve, na sua fabricação, a frequência otimizada e fixada em 1,1 MHz, para uso em capilares com diâmetro interno no intervalo de 20 até 100 μm . O sinal do oscilador é do tipo senoidal e sua amplitude é de 4 Volts pico-a-pico (Vpp), não sendo possível realizar seu ajuste fino [250].

A base do mecanismo da detecção de espécies em C^4D situa na substituição do co-íon presente no eletrólito de corrida pelo íon a ser analisado. Quando a mobilidade do analito (ex: $\text{Na}^+ \approx 51,9 \text{ cm}^2 / \text{V s}$) for maior que a do co-íon do eletrólito (ex: $\text{TRIS} \approx 29,5 \text{ cm}^2 / \text{V s}$) ocorre um aumento da condutividade nessa região do capilar e o detector é sensibilizado, obtendo o registro de um pico positivo no eletroferograma. O contrário também é válido, no caso em que o co-íon do BGE possui maior mobilidade (ex: oxalato $\approx 77,0 \text{ cm}^2 / \text{V s}$) que o íon do analito (ex: $\text{COD} \approx 24,0 \text{ cm}^2 / \text{V s}$), resultando em um pico negativo no eletroferograma. Cabe salientar que ao se tentar analisar compostos com mobilidades similares ao co-íons presentes no BGE, há pouco ou nenhum distúrbio na condutividade daquela região do capilar, podendo apresentar baixas sensibilidades ou até mesmo ausência de detecção, como é o caso de se tentar realizar análises de COD em um BGE contendo TRIS [251]. Deste modo, quanto maior for diferença de mobilidade do BGE em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector. Portanto deve-se ter atenção na escolha do eletrólito de corrida ao se usar C^4D como detector, pois este possui papel fundamental na sensibilidade de cada analito. Uma abordagem pouco utilizada para se elevar a mobilidade do BGE, mas mantendo as propriedades tamponante é a adição de sais, como o NaCl, à sua composição [252]. Tal tópico será melhor apresentado adiante.

Na injeção de soluções aquosas contendo os analitos de interesse, a água, que embora não seja íon, tem uma menor mobilidade do que a mobilidade de qualquer BGE utilizado, então cada eletroferograma normalmente terá um pico negativo. Esse pico negativo, juntamente com outras espécies neutras (excipientes e/ou possíveis produtos de degradação) que co-migraram com a água é o marcador do EOF quando se usa C^4D .

O fato de outras espécies neutras co-migrarem com a água (geralmente o componente em maior quantidade no “*plug*” de amostra), faz com que o sinal analítico

esperado para todas as espécies sejam somados entre si e com o da água, ocultando qualquer possibilidade de determinação destes compostos. Essa limitação tanto da técnica CE quanto principalmente do detector C⁴D, pode ser superada ao se acoplar outro tipo de detecção ao sistema, como por exemplo, UV-vis ou MS, assim esta conexão em série de detectores, em conjunto com uma técnica de separação, se transforma em uma poderosa ferramenta analítica, capaz de se determinar também compostos neutros. Caso seja escolhida realizar uma detecção “*tandem*” CE-C⁴D-MS, essa abordagem causaria um aumento significativo no custo das medidas eletroforéticas, sem mencionar as limitações exigidas em relação à composição volátil do BGE e no preparo de amostras/padrões para sistemas MS, podendo não solucionar todos os problemas com as moléculas neutras, uma vez que ainda haveria dependência da fonte de ionização para MS, bem como analitos com relação carga/massa baixos que se encontram no limite de sensibilidade desta detecção [232].

Ainda, tal composição específica do BGE para adequar ao detector MS afeta também a resolução entre os picos, uma vez que ao se utilizar água como solvente para as soluções de padrão e amostra, o potencial aplicado na região do “*plug*” injetado será realçado e distribuído nas espécies presentes (região com menor resistência), assim, quanto maior for a diferença de mobilidade entre o solvente e a molécula, mais focado será o campo aplicado pela diferença de potencial. Esse fenômeno é conhecido como efeito “*stacking*”[253-255]. Em outras palavras, este efeito é resultante do movimento das moléculas da amostra pela extensão das fronteiras do “*plug*” de injeção, que separa as regiões das distintas forças de campo elétrico. Moléculas migram mais rapidamente nas regiões de maior campo elétrico (menor resistência) e mais lentamente em regiões com menor força do campo elétrico (maior resistência)[256].

Deste modo elevar a mobilidade do BGE se faz imperativo para que possa se ter um maior efeito “*stacking*” e determinar simultaneamente ambos PAR e outro analito em menor concentração, com boa resolução. Ao se aumentar a condutividade do BGE, pela adição de um sal como o NaCl, de acordo com Ding, W. *et al.* [252], também fica garantida uma melhora na estabilidade do sistema, uma vez que a força iônica do BGE fica maior do que a força iônica dos analitos.

1.7 Análises por CE

É comum ao se desenvolver um método analítico, que a busca por seletividade e sensibilidade se sobreponha ao tempo de análise deixando por vezes em segundo plano a frequência analítica. Geralmente, métodos analíticos que possuem menores limites de detecção e melhor seletividade se destacam, mesmo possuindo maiores tempos de análise. Atualmente este paradigma vem sendo derrubado pela necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos para serem ambientalmente amigáveis, com menores demandas no volume de reagentes e energia, e consequentemente menores impactos ambientais.

Neste âmbito, as separações utilizando CE, que geralmente já são rápidas e geram poucos resíduos, podem tornar-se ainda mais rápidas por duas estratégias distintas: utilizando instrumentos com vários capilares, o qual permite realizar separações de várias amostras simultaneamente [257], ou, como uma alternativa mais barata e menos trabalhosa, utilizar capilares com comprimento reduzido [258]. Ao se reduzir o comprimento do capilar (potencial aplicado constante), obtém-se reduções significativas nos tempos de migração das espécies, pois o tempo de migração (t_m) é afetado inversamente pelo potencial aplicado (E) e diretamente pelo comprimento efetivo do capilar (l) e seu comprimento total (L), como pode ser visto na Equação 13 [259].

$$t_m = \frac{l \times L}{E \times (\mu_{ep} + \mu_{eo})} \quad (13)$$

Considerando que o número de pratos (N) pode ser calculado pela Equação 13, na qual se faz necessário o valor do coeficiente de difusão (D), a mobilidade eletroforética (μ_{ep}) e o potencial aplicado (E), e realizando o rearranjo matemático necessário entre a Equação 13 e 14, podemos obter a Equação 15.

$$N = \frac{\mu_{ep} \times E}{2 \times D} \quad (14)$$

$$N = \frac{\left(\frac{lL}{t_m}\right) - E \times \mu_{eo}}{2 \times D} \quad (15)$$

Como pode ser visualizado na Equação 15, o número de pratos fica atrelado não somente ao tamanho do capilar (l e L), sendo principalmente inversamente proporcional ao produto entre potencial aplicado (E) e a mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}). Assim, para se manter uma boa eficiência e aumentar o número de pratos, deve se elevar o tamanho do capilar, sem reduzir o campo elétrico proveniente do potencial aplicado. No entanto, como o campo é distribuído por todo capilar, ao se aumentar o comprimento deste, por exemplo, pelo dobro do tamanho, implica que o potencial aplicado a cada cm do capilar cairá pela metade, e assim prejudicará à análise em relação ao tempo de migração. Deste modo, um problema que pode ocorrer ao se elevar o potencial aplicado (E) para suprir o aumento do capilar (l e L), sem perder no tempo de análise, reside no fato de que quanto maior o potencial aplicado, menos eficiente se torna a dissipação do calor gerado pela passagem de maior corrente elétrica ao se elevar a diferença de potencial aplicado (efeito Joule), causando instabilidade no sistema e limitando a técnica de separação [218, 260].

Como na CE, a separação é normalmente conduzida em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 20 a até 100 cm de comprimento, preenchidos com um BGE, submetidos à ação de um campo elétrico, pode se dizer que a relação entre a área superficial interna e o volume do capilar é grande, mesmo sendo demandado pequeno volume de amostra, geralmente da ordem de 1 a 10 nL, em capilares menores, há uma melhor dissipação de calor [218].

O uso de CE acoplado a detectores C^4D em análises com elevadas frequências analíticas é comum, como já demonstrado na determinação de ciprofloxacino [261], propranolol [262] e fosfato de oseltamivir no medicamento Tamiflu[®] [263]. Além da análise de fármacos, é possível encontrar na literatura vários trabalhos com CE- C^4D focados em análises rápidas em outros tipos de analitos e matrizes, como determinação de metais em biodiesel [264]; um medicamento para tratamento de tuberculose e seu produto de degradação [265]; dois grupos de fármacos, sendo 8 em uma corrida e 5 em outra [266] e quantificação de benzoato e sorbato em bebidas [267]. Em todos estes trabalhos, as análises foram realizadas em menos de 2 minutos.

1.8 Determinação simultânea de compostos catiônicos e aniônicos orgânicos

As moléculas de fármacos, em sua grande maioria, são comercializadas na forma de compostos iônicos moleculares e devem ser analisadas em várias etapas do processo farmacêutico, desde seu desenvolvimento até o controle de qualidade final [268]. Algumas propriedades físicas como solubilidade, higroscopicidade, pH em solução, ponto de fusão, taxa de dissolução, estabilidade química e mecânica, e ainda a forma do cristal são todas definidas pelo par de íons que forma o composto. Neste caso, a determinação de cátions e ânions é importante devido à possível presença de impurezas que podem ser provenientes da catálise do fármaco ou do processo de fabricação que podem afetar as propriedades supracitadas, gerando efeitos indesejáveis no usuário do medicamento [269]. A determinação simultânea de cátions e ânions em formulações farmacêuticas é de interesse de grandes companhias como a Dionex[®] [269] e a Shimadzu[®] [268] que comercializam equipamentos de cromatografia líquida com esta finalidade.

Uma das alternativas ao uso dos equipamentos citados acima que pode ser localizadas na literatura, é a determinação simultânea de cátions e ânions via HPLC (cromatografia de íons) utilizando-se mais de uma coluna específica, em um único procedimento, para íons positivos e negativos [270] ou colunas de troca catiônica e aniônica [271], o que aumenta o custo do método. O uso de colunas com polímeros de caráter anfótero como fase estacionária também é uma opção [272]. Porém, o uso de cromatografia de íons em análises simultâneas de cátions e ânions requer instrumentação complexa (injetores duplos) e muitas vezes mais do que um tipo de eluente e/ou coluna [273].

A escolha de CE-C⁴D, devido a sua instrumentação mais simples, para a determinação simultânea de cátions e ânions contorna alguns dos obstáculos citados acima, como por exemplo, a necessidade de se dispor de duas colunas e diferentes soluções como fase móvel. Métodos baseados em CE que permitam a separação simultânea de espécies aniônicas e catiônicas são desenvolvidos devido ao grande interesse em aumentar a frequência analítica, minimizando o gasto com soluções além de reduzir o trabalho das trocas de polaridade do potencial aplicado quando se realiza a inversão do EOF pela modificação morosa da superfície interna do capilar utilizado.

Dentre as estratégias que podem ser usadas na separação simultânea de ânions e cátions através de CZE, a introduzida por Kubán e Karlberg [274], a qual compreende

a injeção dupla da amostra (em ambas as extremidades do capilar) com o detector posicionado próximo ao centro do capilar, possui características interessantes. Desta forma, os cátions inseridos no lado de injeção do pólo positivo (ânodo) migram no sentido normal ao EOF e os ânions injetados no pólo negativo (cátodo) migram em sentido contrário ao EOF [275]. Neste caso é comum trabalhar em condições em que a velocidade do EOF é baixa. Com intuito de exemplificar tal abordagem, temos a determinação simultânea e estequiométrica de hidrocloreto de labetalol [235] e sulfato de catarantina e ditartarato de vinorelbina [276], fármacos básicos e isômeros de ácidos fracos [277], espécies nitrogenadas em água pluvial [278], distintas proteínas [279], compostos orgânicos e outros fármacos [280], além de outros trabalhos com vários íons inorgânicos como K^+ , NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , Na^+ , F^- , HPO_4^{2-} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- e Li^+ [281-283].

Existem modificações nesse tipo de abordagem que culminam no mesmo efeito. Uma destas modificações baseia-se na manipulação dos “*plugs*” de amostra ao se realizar a injeção das duas amostras, uma catiônica e uma aniônica, porém, a que for injetada no sistema primeiro, terá seu “*plug*” transportado hidrodinamicamente para o fim do capilar, para em seguida se injetar o segundo “*plug*” de amostra [284]. Há ainda modalidades de separação simultânea de cátions e ânions ao se utilizar simultaneamente dois capilares concorrentes, conhecida como CE de canal duplo (“*dual-channel capillary electrophoresis*”) [285, 286].

Uma outra abordagem é a utilização do sistema de CZE regular atrelado a um EOF com elevada velocidade de migração, com intuito de mover os analitos catiônicos (modo co-EOF) e aniônicos lentos por arraste contra fluxo (modo contra-EOF) até o detector (EOF normal). Esta estratégia também pode ser utilizada com o EOF invertido (ânions no modo co-EOF e cátions lentos no modo contra-EOF) no entanto, tal arraste será feito nos analitos catiônicos lentos [287]. A execução desta abordagem é mais simples do que as apresentadas anteriormente, pois usa condições em que se tem um elevado EOF (pH elevado), para que ambos cátions e ânions migrem na mesma direção através do detector [251, 288-291]. Normalmente, é possível de se implementar essa abordagem em equipamentos comuns de CE. Ainda, outra abordagem, com maior complexidade de performance baseia-se na complexação de espécies catiônicas com um composto quelante aniônico de carga maior, obtendo assim novas espécies carregadas negativamente, sendo todos analitos separados de modo convencional, mas com o EOF invertido, como ânions [292-294].

1.9 Adição de NaCl ao BGE

Comumente, quase todos os trabalhos da literatura que utilizam CZE são realizados em amostras contendo relativamente baixas concentrações totais de íons, sendo que poucos trabalhos abordam amostras com elevadas diferenças de concentração entre os analitos. No caso apresentado nesta tese há uma grande diferença entre a quantidade de PAR de até 50 vezes mais do que outro analito na mesma formulação e, devido a este fato, normalmente poderiam ser necessárias pelo menos duas diluições da amostra contendo tal diferença de concentração entre analitos, uma vez que o sinal analítico do PAR poderia ultrapassar os limites de detecção superior de alguns detectores (“*overload*”), ao se tentar determinar o analito de menor concentração. Outra abordagem para amostras que normalmente requeiram diluição, é a de se remover o analito em maior concentração [295-297], não sendo desta forma possível de se realizar a determinação simultânea de ambos analitos em uma única análise. Assim, a injeção direta de amostras contendo elevada concentração total de íons raramente ocorre sem algum pré-tratamento de amostra.

Geralmente, uma elevada concentração de íons está atrelada à uma elevada força iônica e, sem pré-tratamento de amostras com tal perfil, pode ocorrer competição entre os íons migrantes dentro do capilar com aqueles que compõem a dupla camada elétrica na superfície interna do capilar (provenientes do BGE), gerando resultados irreprodutíveis, uma vez que a composição do BGE se altera a cada corrida eletroforética. Uma estratégia pouco utilizada é a adição de sal ao BGE para que se eleve a força iônica do mesmo. Alguns casos são reportados na literatura como a adição de sais de metais alcalinos [298-300], sais de sódio do ácido fítico [301], ou sais zwitteriônicos [302], com intuito de suprimir a troca aniônica com o capilar e prevenir absorção de proteínas na sílica fundida.

Essa estratégia de se adicionar sais ao BGE pode causar um excesso de aquecimento do capilar, gerado pelo efeito Joule, afetando negativamente a qualidade da separação e podendo causar distorções no formato dos picos. Fatores como menores diferenças de potenciais, maiores comprimentos de capilar ou redução do diâmetro interno dos mesmos, podem colaborar para redução do efeito Joule, no entanto, essas abordagens causam o inconveniente de se aumentar os tempos de análise.

Ao se adicionar quantidades adequadas de sais, como o NaCl, ao BGE, é possível balancear o ganho de calor do sistema, sem se fazer necessárias alterações no potencial aplicado ou no capilar, sendo possível de se trabalhar com determinações fundamentalmente em uma etapa sem longos tempos de análise. Segundo Ding *et al* [252], uma boa relação de custo e benefício para tais casos é provida ao se adicionar sais ao BGE para que o mesmo chegue a cerca de três vezes a força iônica das amostras em questão, gerando eletroferogramas de qualidade aceitável.

2 Objetivos

O objetivo principal neste trabalho foi desenvolver métodos analíticos rápidos e de baixo custo para controle de qualidade de medicamentos usando Eletroforese Capilar com Detecção Condutométrica sem Contato (CE-C⁴D) para a análise de formulações farmacêuticas contendo paracetamol (PAR) na presença de outros princípios ativos em combinações atualmente comercializadas.

Como objetivos específicos, neste trabalho são propostos métodos simples e rápidos, todos com tempos de corrida eletroforética com tempos inferiores à dois minutos, usando a técnica de CE-C⁴D para determinação de 14 fármacos:

- (i) determinação simultânea de PAR (ânion) e cátions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas: codeína (COD), orfenadrina (ORP), prometazina (PRO), escopolamina (SCO) e tramadol (TRA);
- (ii) determinação simultânea de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas: naproxeno (NAP), ibuprofeno (IBU), cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF) e ácido ascórbico (ASC).

Ainda como objetivo específico, além dos citados, foi proposta a determinação experimental do valor do pKa da SCO.

3 Parte experimental

3.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (99,8% até 99,9%) sendo utilizados sem purificação prévia. Paracetamol (PAR), escopolamina (SCO), prometazina (PRO), tramadol (TRA), orfenadrina (ORP), codeína (COD), cafeína (CAF), ibuprofeno (IBU), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), ácido acetilsalicílico (AAS), ácido ascórbico (ASC), diclofenaco (DCF), naproxeno (NAP), β -alanina, ácido bórico, 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (TRIS), ácido [(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]-1-propanosulfônico (TAPS), hidróxido de lítio e etanol foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Hidróxido de sódio, cloreto de sódio (NaCl), trietanolamina (TEA) e ácido oxálico (OXA) foram adquiridos da Synth. Água desionizada ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) foi obtida a partir de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os excipientes encontrados nas bulas das formulações farmacêuticas analisadas neste trabalho, fosfato de cálcio dibásico, amido de milho, dióxido de silício coloidal, hidroxipropilcelulose, carboximetilamido sódico, estearato de magnésio, hidroxipropilmetilcelulose, óleo de rícino polietoxilado, talco, dióxido de titânio e óxido de ferro, foram gentilmente doados, em quantidades suficientes para execução dos experimentos, pela farmácia de manipulação Nossa Senhora da Guia, Uberlândia - MG.

Todas as formulações farmacêuticas foram obtidas em drogarias locais na cidade de Uberlândia -MG. Amostras de diferentes fabricantes contendo PAR na presença de outra(s) molécula(s) foram analisadas: (1) PAR + ORP; (2) PAR + COD; (3) PAR + SCO; (4) PAR + TRA; (5) PAR + PRO; (6) PAR + CAF + DIP, (7) PAR + PIR, (8) PAR + AAS, (9) PAR + NAP, (10) PAR + DCF + CAF, (11) PAR + ASC. Para cada amostra, 6 comprimidos foram pulverizados e homogeneizadas em almofariz com pistilo. Em seguida, uma massa adequada do pó foi dissolvida em água deionizada em um balão volumétrico para se chegar na concentração desejada. Devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, soluções amostra e padrão contendo NAP foram solubilizadas em 10% de etanol. O método foi avaliado ainda através da análise das amostras farmacêuticas reais mediante ensaios recuperação. Amostras foram adequadamente preparadas em uma concentração de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito para serem analisadas antes e após adição de uma concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Cabe ainda ressaltar que, como na formulação dos medicamentos em questão, além dos princípios ativos determinados neste trabalho, também existiam excipientes, em quantidades desconhecidas. Soluções contendo, isoladamente, excesso de padrão de cada um dos excipientes foram preparadas em água deionizada e injetadas no sistema, nas mesmas condições e BGE otimizados, gerando o mesmo sinal analítico obtido a partir do branco (injeções apenas com água deionizada). Portanto, os excipientes não causaram interferência nos resultados obtidos e assim são considerados inertes à determinação pelo método proposto.

Inicialmente, quatro composições distintas de BGE foram testados para se conseguir abranger vários valores de força iônica ($BGE\ 2 < BGE\ 3 < BGE\ 4 < BGE\ 1$) e distintas capacidades tamponantes, sendo eles: BGE-1 = 10 mmol L⁻¹ ácido bórico + NaOH (pH 9,5); BGE-2 = 10 mmol L⁻¹ TRIS + 10 mmol L⁻¹ TAPS (pH 8,4); BGE-3 = 10 mmol L⁻¹ OXA + TEA (pH 8,6); BGE-4 = 10 mmol L⁻¹ β-alanina + NaOH (pH 9,5). Foi selecionado o BGE 4 e experimentos de otimização neste BGE foram realizados na faixa de pH, entre 9,4 e 9,7.

De acordo com o trabalho publicado por Ding *et al.* [252], ao se adicionar um sal ao BGE, em no mínimo três vezes a força iônica das amostras, é possível se obter melhora no sinal analítico sem causar prejuízo de ruído ou mesmo problemas pela oscilação de temperatura (efeito Joule). Deste modo, foram adicionados 1, 4 e 10 mmol L⁻¹ de NaCl em soluções do BGE com intuito de se verificar a modificação na relação sinal/ruído dos analitos em estudo.

Os estudos para determinar o pKa da SCO foram obtidos pela injeção de uma solução padrão contendo 200 μmol L⁻¹ de SCO e de COD (selecionada para ser o PI) no BGE de composição MES/HIS 10 mmol L⁻¹ em concentração equimolar pH 6,0 e também no BGE de composição TRIS/TAPS 10 mmol L⁻¹ em concentração equimolar pH 8,4. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas as medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 μm de diâmetro interno) com 40 cm de comprimento efetivo (L_D) e 50 cm de comprimento total (L_T).

Os melhores resultados foram obtidos nos seguintes BGEs para cada caso: para cátions orgânicos e PAR: 20 mmol L⁻¹ β-alanina + 4 mmol L⁻¹ NaCl + NaOH, pH = 9,6; para PAR, CAF e IBU: 10 mmol L⁻¹ DMX, 10 mmol L⁻¹ β-alanina + LiOH, pH =

10,4; para PAR e NAP: 20 mmol L⁻¹ β alanina + KOH, pH = 10,5; para o grupo B (PAR+DIP+AAS, na presença e na ausência de CAF), para o grupo C (PAR+PIR+ASC) e para o grupo D (PAR+DCF, na presença e na ausência de CAF) foram utilizadas duas composições de BGE, uma para análises dos fármacos sem a presença de cafeína e outra composição para quando CAF foi determinada, sendo elas 20 mmol L⁻¹ β-alanina + 4 mmol L⁻¹ NaCl + NaOH, pH = 9,6; e 10 mmol L⁻¹ DMX + 20 mmol L⁻¹ β-alanina + NaOH, pH = 10,4; respectivamente. As composições de BGE utilizadas estão resumidas na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição do BGE em cada um dos métodos propostos.

Método Proposto	Analitos	Composição do BGE
1	Cátions orgânicos (SCO, TRA, PRO, ORP e COD) com PAR	20 mmol L ⁻¹ β-alanina + 4 mmol L ⁻¹ NaCl + NaOH, pH = 9,6
2	Ânion orgânico IBU com PAR na presença de CAF	10 mmol L ⁻¹ DMX, 10 mmol L ⁻¹ β-alanina + LiOH, pH = 10,4
3	Ânion orgânico NAP com PAR	20 mmol L ⁻¹ β alanina + KOH, pH = 10,5
4	Ânions orgânicos (DIP, AAS, PIR, ASC e DCF) com PAR	20 mmol L ⁻¹ β-alanina + 4 mmol L ⁻¹ NaCl + NaOH, pH = 9,6
5	Ânions orgânicos (DIP, AAS e DCF) com PAR na presença de CAF	10 mmol L ⁻¹ DMX + 20 mmol L ⁻¹ β-alanina + NaOH, pH = 10,4

As soluções dos BGEs propostos como ideais, a serem utilizados nos experimentos, foram preparadas diariamente, por conveniência e redução de erros, num volume total de 20 mL, no entanto, apenas cerca de 3 mL de tais soluções eram utilizados no sistema durante as análises, apresentando assim um pequeno consumo de reagentes e, conseqüentemente, pequena geração de resíduos de baixo impacto ambiental (toxicidade).

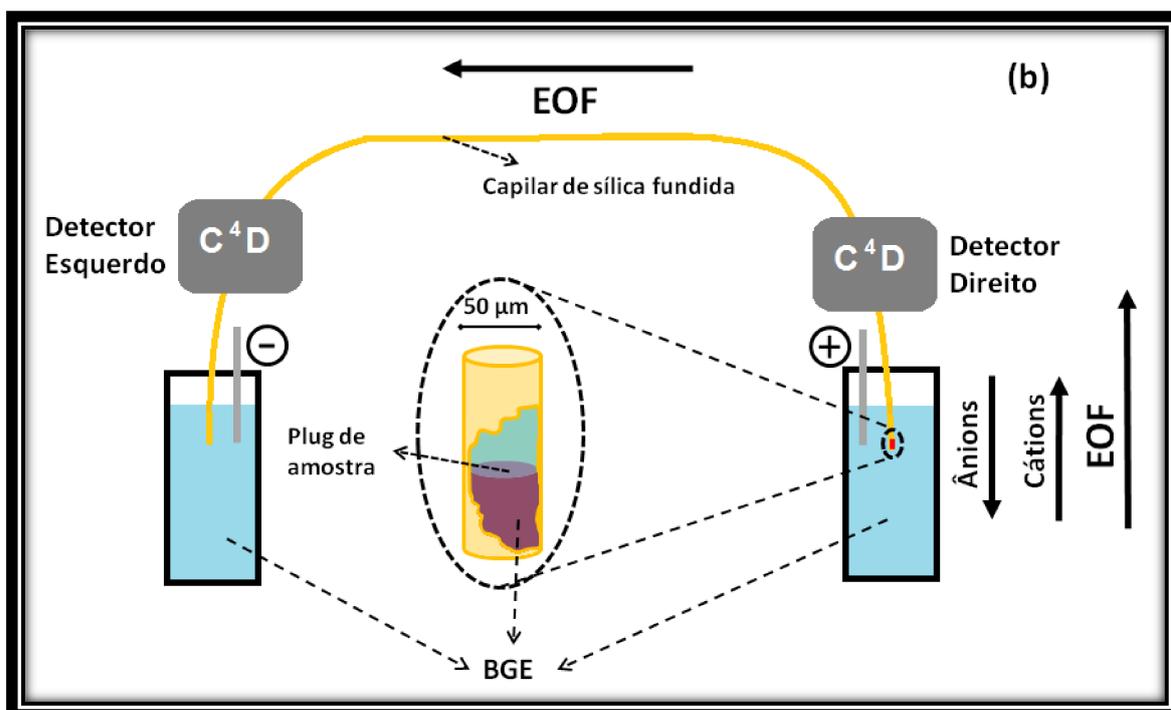
Antes da injeção no sistema CE- C^4D , todas as soluções amostras ou padrões foram filtradas com um filtro de membrana PTFE de seringa (tamanho de poro de 0,45 μm).

3.2 Instrumentação

Todos os eletroferogramas foram obtidos utilizando um equipamento de CE construído no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP e adquirido para uso no laboratório do Professor Eduardo Mathias Richter: Núcleo de Pesquisas em Eletroanalítica - Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (NuPE-UFU). O aparelho de CE é equipado com dois detectores condutométricos compactos e de alta resolução sem contato acoplados capacitivamente (C^4D) [241].

O funcionamento do equipamento, bem como a estratégia de análise utilizada nos trabalhos estão esquematizados na Figura 20. O equipamento de CE usado neste trabalho possui dois destes detectores como pode ser visualizado na Figura 21.

Figura 20 - Esquema do sistema CE e modo de injeção hidrodinâmica (pressão positiva) usado nesse trabalho.



Fonte: Autor (2017).

Figura 21 - Imagem do equipamento de CE (com porta aberta) usado nesse trabalho, com destaque indicando a posição dos dois detectores C⁴D.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A versão utilizada, em todos os experimentos desta tese, do C⁴D não possui partes móveis, como potenciômetros e conectores, sendo assim, o detector é compacto e robusto. Um oscilador, trabalhando na frequência de 1,1 MHz, foi otimizado para uso de capilares com diâmetro interno no intervalo de 20 até 100 µm. O sinal do oscilador é do tipo senoidal e sua amplitude é de 4 Vpp [250].

As injeções foram feitas com aplicação de pressão positiva fixa (25 kPa) no lado direito do equipamento, sendo este o ânodo no modo normal para determinação de cátions. 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 50 cm de comprimento totais, 50 µm de diâmetro interno e 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 40 cm (comprimento efetivo). Antes da utilização, os capilares foram pré-condicionados por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos, em seguida com água deionizada durante 10 minutos e, finalmente, com o BGE a ser utilizado nos experimentos durante 10 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a uma pressão constante de 25 kPa. O equipamento de CE continha uma fonte de alta tensão bipolar com capacidade máxima de 30 kV. No entanto, o potencial máximo aplicado com segurança era de 25 kV. Fugas de alta tensão, provavelmente devido à problemas com aterramento e isolamento do sistema, foram observadas em potenciais maiores.

As medidas de pH foram realizadas com o medidor de pH portátil “SPEAR” (OAKTON, Vernon Hills, IL, EUA) devidamente calibrado, à 25 °C.

4 Resultados e discussões

4.1 Parte I: Desenvolvimento de um novo método para determinação simultânea de PAR e cátions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas.

Normalmente, as análises por CE são realizadas com as espécies de interesse se movimentando (migrando) no interior do capilar na mesma direção do fluxo eletrosmótico (EOF) com o intuito de aumentar a velocidade da análise (mobilidade eletroforética + mobilidade eletrosmótica = modo co-EOF). Em um capilar de sílica fundida sem modificação, o EOF se movimenta em direção ao polo negativo, na mesma direção dos cátions. Devido ao caráter aniônico do PAR em soluções aquosas com pH superior a pH 8 ($pK_a = 9,4$), uma prática comum na determinação deste fármaco por eletroforese capilar de zona (CZE) seria a inversão do EOF, o que muitas vezes é feito através da adição de um agente tensoativo (surfactante) catiônico na composição do BGE (análise de ânions no modo co-EOF) [303].

Confrontando o comportamento do PAR, as moléculas de SCO, PRO, TRA, ORP e COD são espécies catiônicas em soluções com $pH < 7$ e perdem gradualmente sua carga positiva à medida em que o pH da solução é elevado para valores mais alcalinos (Tabela 1 e Figuras 3 a 7). Na determinação destas moléculas por CZE, o ideal seria utilizar um BGE com pH abaixo de 7 (equilíbrio com todas as moléculas com carga positiva), no entanto, nesta condição, as moléculas de PAR ($pK_a = 9,4$) estarão praticamente neutras e sua determinação por CZE não seria possível. Outro fator que corrobora com a necessidade de se utilizar valores de $pH > 8$ é que acima de tais valores temos a velocidade do EOF no valor máximo (para capilar de sílica, sem modificação) e, assim, possibilitando as determinações rápidas de cátions no modo co-EOF e ânions lentos no modo contra-EOF. Nesta condição, ânions lentos chegam ao detector logo após o sinal do EOF (moléculas neutras).

Como esses analitos são geralmente encontrados associados ao PAR em formulações farmacêuticas, é de grande interesse analítico o desenvolvimento de um método que permita a determinação tanto de PAR (na forma aniônica) e estes cátions orgânicos simultaneamente.

No caso de CZE, mais especificamente, utilizando um capilar de sílica durante os experimentos, existem duas abordagens em se tratando de determinação simultânea de cátions e ânions. Uma primeira opção seria realizar as corridas

eletroforéticas sem adição de qualquer modificador de EOF e assim as espécies migrariam na ordem prioritária de cátions, em seguida as moléculas neutras, e por último, os ânions contra o EOF. A segunda maneira de se realizar a determinação simultânea de íons positivos e negativos seria adotando o uso de um inversor de fluxo (geralmente um tensoativo catiônico) e invertendo a ordem de migração das espécies para primeiramente os ânions, seguidos pelas moléculas neutras e por último os cátions.

No entanto, tal inversão no EOF aumenta a complexidade do método por adicionar mais uma etapa de preparação no BGE ao se adicionar o inversor de fluxo na sua composição. O uso de um inversor de EOF também requer um tempo adicional para que o equilíbrio do sistema seja atingido. Ainda, como os demais analitos de interesse, que serão determinados em conjunto ao PAR, se comportam como espécies catiônicas em soluções com $\text{pH} < 8$, é possível afirmar que caso se utilizasse o EOF invertido, seriam obtidos sinais analíticos após o sinal do EOF, sem ganho em tempo de análise, uma vez que teríamos que esperar os sinais destes cátions (migrando contra o EOF) para encerrar a corrida eletroforética (simular ao outro procedimento proposto).

4.1.1 Estudo da composição do BGE

Para se realizar a determinação de PAR e dos fármacos catiônicos deste estudo (SCO, PRO, TRA, ORP e COD) foi decidido não usar a abordagem com presença de tensoativo catiônico na composição do BGE, mantendo o EOF no modo normal, sem inversão.

Devido ao fato destes cátions orgânicos se comportarem como bases fracas e o PAR por sua vez, como ácido fraco, inicialmente, alguns BGE's com distintas capacidades tamponantes na faixa de pH de 8 a 10 foram estudados, com intuito de se ter ideia do comportamento dos analitos em diferentes composições e pHs dos BGE's. Foram utilizados nestes experimentos quatro composições distintas de BGE para se conseguir abranger vários valores de força iônica ($\text{BGE } 2 < \text{BGE } 3 < \text{BGE } 4 < \text{BGE } 1$) e distintas capacidades tamponantes, sendo eles: BGE-1 = 10 mmol L⁻¹ ácido bórico + NaOH (pH 9,5); BGE-2 = 10 mmol L⁻¹ TRIS + 10 mmol L⁻¹ TAPS (pH 8,4); BGE-3 = 10 mmol L⁻¹ OXA + TEA (pH 8,6); BGE- 4 = 10 mmol L⁻¹ β-alanina + NaOH (pH 9,5).

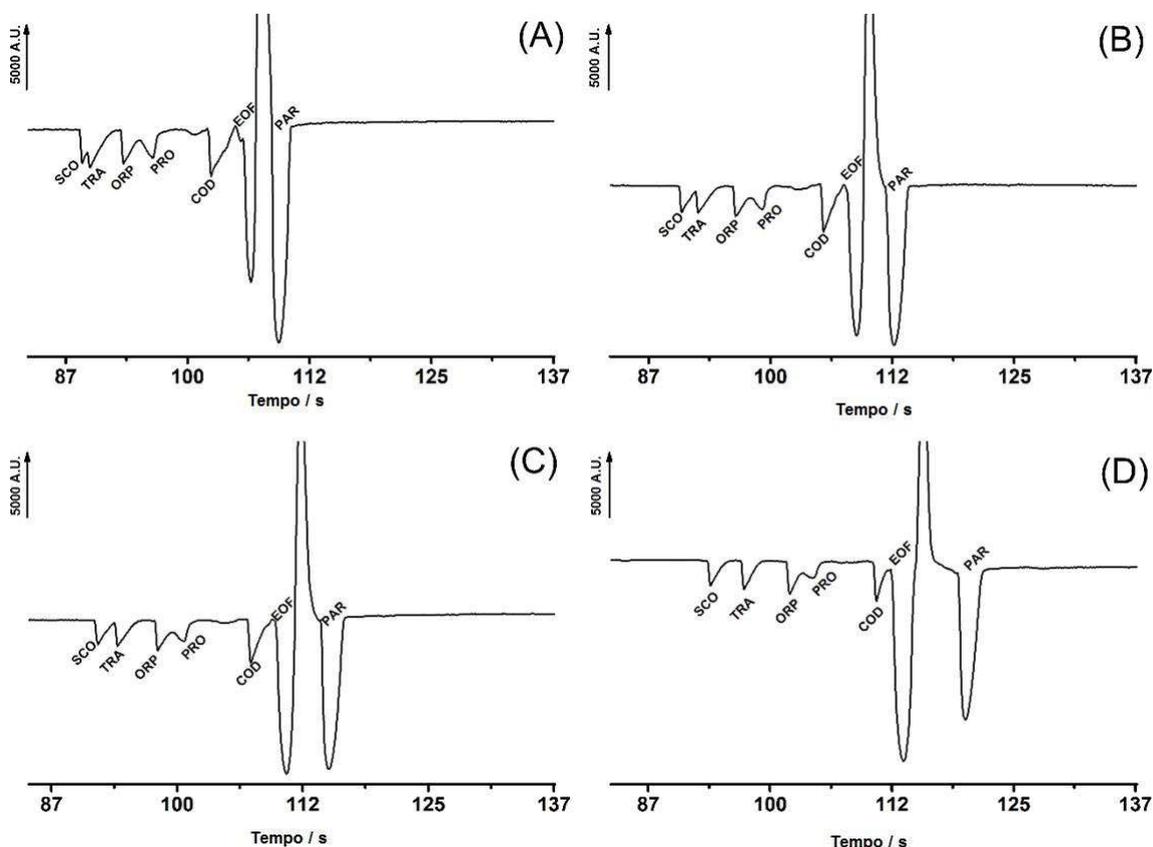
A força iônica do BGE desempenha um papel de fundamental importância, quando se trata de determinação de compostos de baixa mobilidade eletroforética. Assim como discutido na introdução sobre a formação do sinal analítico da água (marcador do EOF em CE-C⁴D), quanto maior for a diferença entre a força iônica

(mobilidade/condutividade) do BGE e do composto a ser analisado, maior será a sensibilidade para o método. Caso o fármaco em estudo possua menor mobilidade do que o BGE, obtemos um sinal analítico negativo, similar ao da água. E o oposto é verdadeiro, quando se obtém sinais analíticos positivos, o analito possui maior mobilidade que o BGE. Para aumentar o sinal analítico deve-se, portanto, aumentar essa janela de mobilidade entre o BGE e o analito. Como a COD possui a menor mobilidade de todos os analitos em questão, quanto maior a mobilidade do BGE, maior o sinal gerado para este fármaco.

Dentre os BGEs testados, o BGE-4 permitiu um melhor desempenho para a determinação dos analitos em questão, tendo influenciado a decisão os melhores parâmetros de capacidade tamponante em $\text{pH} \approx 9,5$; baixos ruídos na linha de base; entre outros. Assim, o BGE-4 foi escolhido para prosseguir nos estudos visando determinação rápida dos seis analitos utilizando o segundo detector do equipamento CE-C⁴D (comprimento efetivo do capilar = 40 cm).

Em seguida, foi estudada condição ideal de pH, para ser mais específico, experimentos foram realizados na faixa de pH, entre 9,4 e 9,7; próxima aos valores de pKa da COD e do PAR, com intuito de se manter o equilíbrio químico suficiente para que cerca da metade das moléculas de PAR (pKa 9,5) estivessem na sua forma aniônica. Por sua vez, tais valores de pH são fundamentais para que os cátions, especificamente a COD (pKa 9,2) não percam completamente sua carga positiva. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Eletroferogramas apresentando a influência do pH nas misturas de padrões contendo 250 μM de SCO, TRA, ORP, PRO, e COD e 4280 μM de PAR. (A) pH 9,4; (B) pH 9,5; (C) pH 9,6 e (D) pH 9,7. BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina + 4 mmol L^{-1} NaCl com pH ajustado com NaOH; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 μm de diâmetro interno) com 40 cm de comprimento efetivo (50 cm de comprimento total).



Fonte: Autor (2017).

Como pode ser visualizado na Figura 22, devido ao sinal analítico para cada espécie, há uma dependência relativamente alta do valor do pH do BGE para a determinação dos analitos em tela, especialmente para o par de analitos COD ($\text{pK}_a = 9,2$; cátion) e PAR ($\text{pK}_a = 9,4$; ânion). Os picos transientes destes dois analitos (cátion e ânion) sempre estarão separados pelo sinal gerado pelas moléculas neutras, o marcador do EOF, e deste modo, qualquer pequena alteração, por menor que seja, no pH do BGE faz com que estes íons co-migrem com o sinal do EOF. Na medida em que se eleva o valor de pH, o pico da COD tende a se aproximar do EOF até ser completamente suprimido. Caso o valor do pH diminua, ocorre o contrário com a COD, no entanto, a mobilidade eletroforética do PAR diminui e, assim, tende a se aproximar do EOF.

Em suma, com o aumento do valor do pH do BGE, de 9,4 para 9,7; a resolução entre o sinal do EOF e o pico que representa o sinal analítico do PAR também aumenta, já que nas condições mais básicas, o percentual de espécies aniônicas no equilíbrio químico do PAR aumenta. Por outro lado, o fenômeno oposto ocorre entre o EOF e o pico correspondente ao sinal analítico da COD. A resolução entre estes dois últimos picos diminui com o aumento do valor do pH devido à queda do percentual de cátions no equilíbrio químico da COD. Além disso, a resolução entre os picos da SCO e do TRA é melhorada gradualmente com o aumento do pH do BGE. E, por último, também pode ser destacado que ainda existe uma baixa resolução entre os picos correspondentes à ORP e a PRO na faixa de pH estudada. Devido à semelhança existente entre as moléculas destes analitos (massa, carga e pKa) a separação não foi possível. Portanto, o BGE com valor de pH 9,6 foi selecionado para os estudos subsequentes.

Em relação ao maior sinal analítico do PAR perante aos sinais dos outros analitos, ilustrada também na Figura 22, se deve ao fato das injeções terem sido realizadas a partir de soluções padrões contendo $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCO, TRA, ORP, PRO, e COD e $4280 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR. A opção por estes valores de concentração está relacionada com as diferentes proporções encontradas em formulações farmacêuticas comerciais. Além disso, buscou-se mimetizar as condições de proporção entre os fármacos e também em relação à força iônica, com intuito de se obter um meio o mais similar possível em relação às influências das quantidades de fármacos encontrados nas amostras (compatibilização de matriz). Deve ser salientado que em todas as amostras, a quantidade de PAR é muitas vezes superior à quantidade dos outros fármacos, e, por este motivo, o uso de uma maior quantidade deste analito neste estudo. A relação de concentração comumente encontrada entre os princípios ativos PAR:SCO, PAR:TRA, PAR:PRO, PAR:COD e PAR:ORP é da razão, em massa, de 50:1, 9:1, 50:1, 17:1 e 13:1, respectivamente.

4.1.2 Determinação do pKa da SCO

Todos os resultados obtidos na Figura 22 corroboram com os valores teóricos de pKa encontrados na literatura e apresentados na Tabela 1. No entanto, os tempos de migração observados para SCO não estão de acordo com o pKa teórico encontrado na literatura ($\sim 6,95$) [11]. De acordo com este valor de pKa e a faixa de pH utilizada os estudos (9,4 a 9,7), a espécie de SCO presentes em seu equilíbrio ácido-base deveriam se apresentar em maior percentual de moléculas neutras e, deste modo, um tempo de

migração mais próximo às moléculas neutras (EOF) seria esperado. No entanto, conforme pode ser observado em todos experimentos da Figura 22, SCO foi o cátion com tempos de migração mais rápido.

Nesse sentido, estudos foram realizados com o intuito de identificar o pKa mais adequado da SCO. Estes estudos foram adaptados a partir do procedimento descrito por Fuguet E. *et al.* [217] devido a sua simplicidade e eficácia para se explorar o valor de pKa da SCO. Segundo tal procedimento, o pKa de uma espécie pode ser calculado a partir dos seguintes tempos de migração: espécie em estudo, um padrão interno (PI) de comportamento semelhante e do EOF. Estes tempos de migração devem ser obtidos em duas situações: i) utilizando um BGE com pH no qual ambas as espécies analisadas estejam totalmente ionizadas e ii) utilizando outro BGE com um valor de pH no qual coexistam as espécies carregadas e neutras. Nesse caso, não importa quão carregadas as espécies se encontram (ignorando seus equilíbrios ácido-base), nem mesmo os valores do pH do BGE, uma vez que matematicamente tais valores são excluídos do cálculo para se obter o valor mais correto de pKa (vide Equação 12). Deste modo, pela necessidade de se ter um PI com comportamento semelhante ao da SCO, no nosso protocolo experimental, COD foi escolhida para este papel, por apresentar um tempo de migração mais próximo ao do EOF, e comportamento já conhecido.

Assim, uma solução padrão contendo $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de COD (PI) e SCO foi analisada em dois BGE's com pH distintos: 1) pH 6,0 composto por MES/HIS 20 mmol L^{-1} , em concentração equimolar; 2) pH 8,4 composto por TRIS/TAPS 10 mmol L^{-1} , em concentração equimolar. Considerando o comportamento e o valor em dúvida de pKa da SCO obtido da literatura (6,95), podemos considerar que uma quantidade muito próxima de 100% das moléculas de SCO se apresentam na sua forma carregada em solução com pH 6,0; e assim, nesta condição, possuem suas mobilidades eletroforéticas no valor máximo, as quais chamaremos de mobilidade limite (μ_A). À medida em que se eleva o pH da solução esses cátions começam a perder sua carga até que em valores de pH 8,4 parte do equilíbrio está deslocado para uma proporção na qual coexistem moléculas neutras e cátions, com um valor específico de mobilidade efetiva (μ_{ef}).

A partir das equações apresentadas na introdução, as quais fornecem a base matemática para o procedimento utilizado, na qual a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) de um ácido monoprótico pode ser expressa como função da sua constante ácida (e

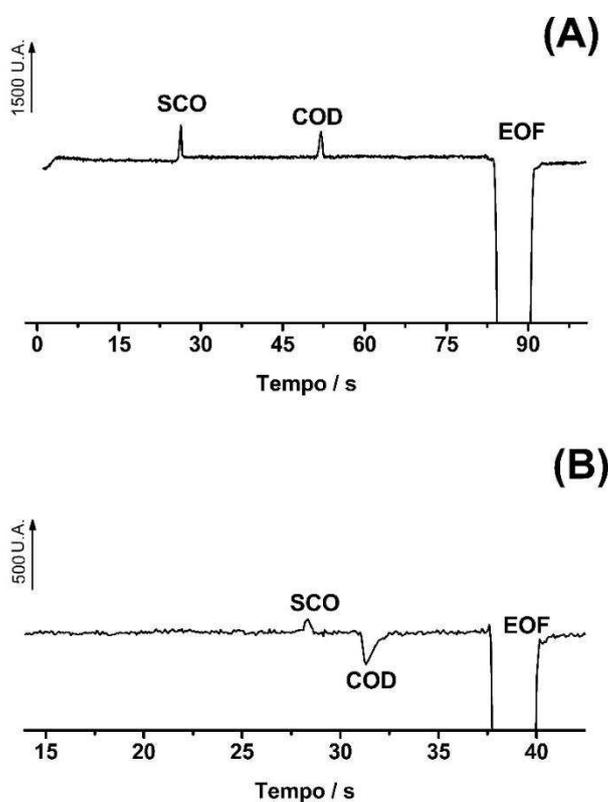
por conseguinte, pelo logaritmo desta constante ácida) e do pH do BGE, utilizando a Equação 12 [217]:

$$pK_{a_{SCO}} = pK_{a_{PI}} + \log \left(\frac{\mu_{A-SCO} - \mu_{ef\ SCO}}{\mu_{ef\ SCO}} \right) - \log \left(\frac{\mu_{A-PI} - \mu_{ef\ PI}}{\mu_{ef\ PI}} \right) \quad (12)$$

Para esta Equação 12 são necessárias apenas as medidas de mobilidade efetiva (μ_{ef}) e mobilidade limite (μ_A). Estes valores podem ser obtidos pela injeção de uma solução contendo ambos os compostos em um sistema CE com BGE com valor de pH onde ambos os compostos estão completamente ionizados (mobilidade limite, μ_A) e, em seguida, injetados em um BGE com valor de pH no qual estão apenas parcialmente ionizados (mobilidade efetiva, μ_{ef}).

Assim sendo, dois eletroferogramas foram obtidos pela injeção de uma solução padrão contendo 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCO e PI nos dois BGE's citados anteriormente. Tais eletroferogramas podem ser visualizados na Figura 23.

Figura 23 - Eletroferogramas obtidos pela injeção uma solução padrão contendo 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCO e PI em MES/HIS 10mmol L^{-1} em concentração equimolar pH 6,0 (A) e em TRIS/TAPS 10 mmol L^{-1} em concentração equimolar pH 8,4 (B). Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 μm de diâmetro interno) com 40 cm de comprimento efetivo (L_D) e 50 cm de comprimento total (L_T).



Fonte: Autor (2017).

A partir dos eletroferogramas apresentados na Figura 23, foi possível obter os tempos de migração de cada analito, bem como do sinal do EOF e, assim, calcular as mobilidades das espécies em cada experimento utilizando a Equação 10. Os valores de tempo de migração, bem como as mobilidades calculadas são apresentadas na Tabela 7. Um outro fenômeno bastante pronunciado nos dois eletroferogramas constantes na Figura 23 é a diferença no comportamento do sinal analítico da COD. Na Figura 23 A, temos um pico positivo e com elevada simetria, enquanto na Figura 23 B, é apresentado um pico negativo, assimétrico com uma cauda no seu final (lado direito). Essa diferença do formato do sinal analítico em cada caso se deve a diferença de mobilidade eletrosmótica da COD em relação à mobilidade eletrosmótica do contra-íon presente no BGE. Discrepâncias de mobilidade geram bandas distorcidas, que apresentam cauda (“*tailing*”) ou cauda frontal (“*fronting*”) [218]. No primeiro caso (Figura 23 A), a mobilidade das espécies carregadas de COD, apesar de próxima, é maior e assim o sinal gerado é positivo. Já no segundo caso (Figura 23 B), o valor da mobilidade eletrosmótica da COD é muito inferior ao valor da mobilidade do respectivo contra-íon no BGE, desta forma há um alargamento do pico proveniente desta diferença de mobilidades. Fisicamente esse fenômeno ocorre, pois, a distribuição espacial das moléculas no interior do capilar é assimétrica, e assim gera distorções locais do campo elétrico aplicado. No do pico com cauda da COD, as moléculas do analito que estão posicionadas na interface entre o BGE e o “*plug*” de amostra, se difundem para a região posterior da interface e entram no BGE. Há então uma diminuição de velocidade de migração das espécies de COD devido a ausência do efeito “*stacking*” (potencial aplicado no BGE é menor que no “*plug*”), e com o tempo tendem a afastar-se do centro da banda, ficando atrasadas em relação às outras e gerando a cauda frontal.

Tabela 7 - Valores de tempo de migração (t_m e t_0 ; \pm SD; $n=3$), mobilidade limite (μA^- ; \pm SD – $n=3$) em MES/HIS 10 mmol L⁻¹ em concentração equimolar (pH 6,0) e mobilidade eletroforética (μ_{eff} ; \pm SD – $n=3$) em TRIS/TAPS 10mmol L⁻¹ em concentração equimolar (pH 8,4) de COD (PI) e SCO.

	t_m SCO ^a	t_m COD ^a	t_0 ^a	μ SCO ^b	μ COD ^b
MES/HIS	26,4 \pm 0,2	52,1 \pm 0,3	83,7 \pm 0,2	1,25 \pm 0,19	0,34 \pm 0,21
TRIS/TAPS	29,4 \pm 0,2	31,3 \pm 0,2	38,6 \pm 0,2	0,38 \pm 0,10	0,29 \pm 0,18

^a (s); ^b (cm² kV⁻¹ s⁻¹). Fonte: Autor (2017).

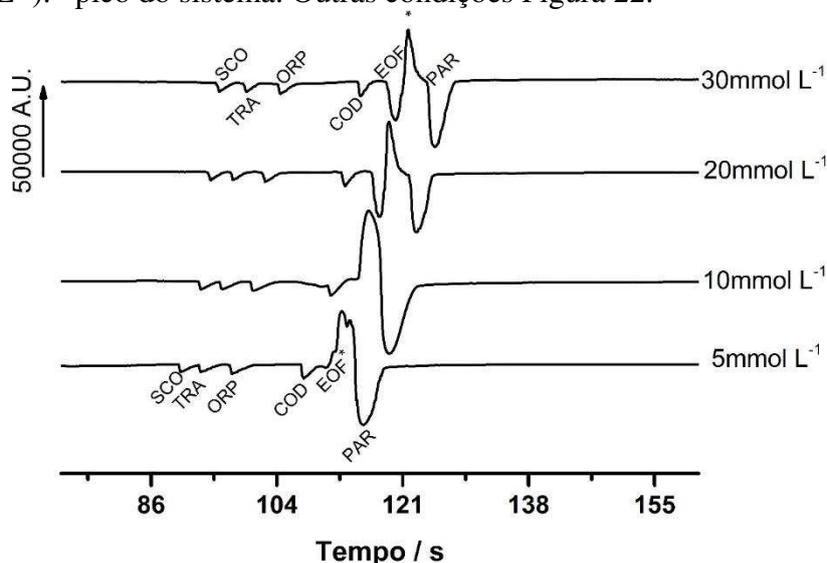
Após concluir os estudos experimentais para determinação do pKa da SCO, foi estimado o valor experimental em aproximadamente 10,2. Tal valor encontra-se muito próximo ao valor esperado de acordo com o tempo de migração observado para a espécie SCO nos eletroferogramas já apresentados. Deste modo, foi possível inferir que este valor experimental de pKa para SCO (10,2) está mais adequado do que aquele encontrado na literatura (6,9).

4.1.3 Estudo da concentração dos componentes do BGE

Uma limitação observada em todos os BGEs testados, neste estudo, foi a baixa sensibilidade (razão sinal/ruído pequena) para todos os cinco cátions orgânicos. Essa limitação provavelmente se deve à pequena diferença de mobilidade existente entre os analitos e os BGEs estudados (detecção condutométrica). Estudos adicionais na composição do BGE selecionado foram realizados para superar esta limitação e assim se obter maiores valores para a razão sinal/ruído (SNR).

O intuito dos estudos de composição do BGE foram focados em determinar se com o aumento da mobilidade do BGE haveria uma maior discrepância entre a mobilidade deste e a dos analitos catiônicos. A opção inicial considerada foi estudar a influência da concentração de β -alanina (5, 10, 20, e 30 mmol L⁻¹) na composição do BGE. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 24.

Figura 24 -Eletroferogramas obtidos pela injeção de cátions (450 μ mol L⁻¹ cada) e PAR (10 mmol L⁻¹), em diferentes BGE com concentrações crescentes de β -alanina (5, 10, 20, e 30 mmol L⁻¹). *pico do sistema. Outras condições Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

Visto que a molécula de β -alanina por si só já oferece baixa mobilidade, ao se estudar a influência da concentração desta na composição do BGE, não houve aumento considerável na mobilidade final do BGE e, portanto, pouca melhora na razão sinal/ruído entre o BGE e os analitos foi observada. Porém, esse estudo foi de utilidade para indicar a melhor capacidade tamponante do BGE selecionado. A medida em que se aumentou a concentração de β -alanina na composição do BGE, melhor foi a capacidade tamponante do mesmo (maiores quantidades de análises puderam ser realizadas sem recondicionamento do capilar).

Não houve discrepância na sensibilidade das espécies, entre as concentrações de 20 e 30 mmol L⁻¹ de β -alanina quando avaliada sua capacidade tamponante. Ainda, à medida que se aumentou a concentração de β -alanina no BGE, foi observado também uma elevação discreta nos tempos de migração de cada analito (≈ 9 s), o que é perfeitamente concordante com a teoria de eletroforese capilar (Equação 4 e 5) [252]. Essa diferença de velocidade em um mesmo potencial de separação pode ser justificada devido a menor concentração do BGE estar relacionada à menor quantidade de cátions que estão sendo atraídos eletrostaticamente pelos grupos silanóis da parede do capilar (além da dupla camada elétrica), e deste modo, o potencial aplicado precisa mover menos moléculas do EOF. Concentrações inferiores não foram testadas devido à diminuição excessiva da capacidade tamponante do BGE. Assim, devido a um comprometimento satisfatório entre a capacidade tamponante e o tempo de análise, a concentração de 20 mmol L⁻¹ de β -alanina foi selecionada para a composição do BGE nos estudos subsequentes.

4.1.4 Estudo da influência de NaCl no BGE

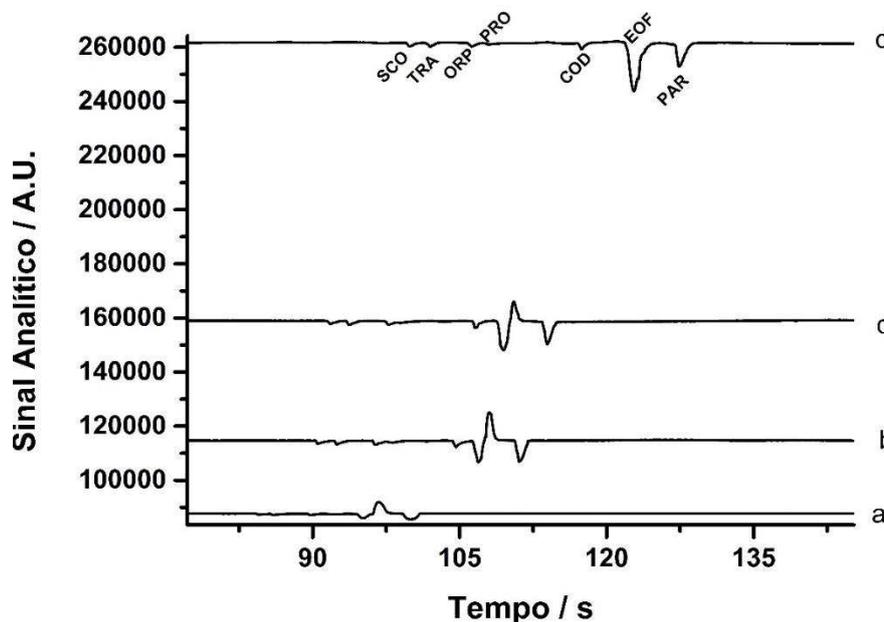
Como a alternativa de se elevar a concentração de β -alanina não logrou êxito em aumentar a mobilidade do BGE, outra abordagem foi estudada: adição de NaCl ao BGE.

De acordo com o trabalho publicado por Ding *et al.* [252], ao se adicionar um sal ao BGE, em no mínimo três vezes a força iônica das amostras, é possível se obter melhora no sinal analítico sem causar prejuízo de ruído ou mesmo problemas pela oscilação de temperatura (efeito Joule). Deste modo, foram adicionados 1, 4 e 10 mmol L⁻¹ de NaCl em soluções do BGE com intuito de se verificar a modificação na relação sinal/ruído dos analitos em tela. Os resultados obtidos neste estudo são

apresentados nos eletroferogramas constantes nas Figuras 25, 26 e 27 e nas curvas de calibração constantes na Figura 28.

Como pode ser visualizado na Figura 25, apesar de melhor separação em 10 mmol L^{-1} entre o par ORP e PRO, fatores como a ausência de linearidade em elevadas concentrações como é o caso do PAR em relação aos outros fármacos e maior tempo de análise, direcionaram a escolha da adição de NaCl para a concentração de 4 mmol L^{-1} . Outro fator que chama a atenção é a mudança na mobilidade do BGE à medida em que se eleva a concentração de NaCl, também se aumenta a condutividade (“gap” entre as linhas base) e conseqüentemente a escala do sinal analítico (A.U.). Notadamente, o pico de sistema após o sinal do EOF desaparece quando se adiciona 10 mmol L^{-1} de NaCl ao BGE, muito provavelmente, devido ao fato de a condutividade/mobilidade do BGE, com esta quantidade de sal em sua composição, se igualou à condutividade/mobilidade da espécie desconhecida que outrora causava o pico do sistema, anulando assim seu sinal analítico.

Figura 25 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de soluções padrões contendo os analitos com adição crescente de NaCl na composição do BGE: a) 0 mmol L^{-1} , b) 1 mmol L^{-1} , c) 4 mmol L^{-1} e d) 10 mmol L^{-1} . Outras condições, vide Figura 22.

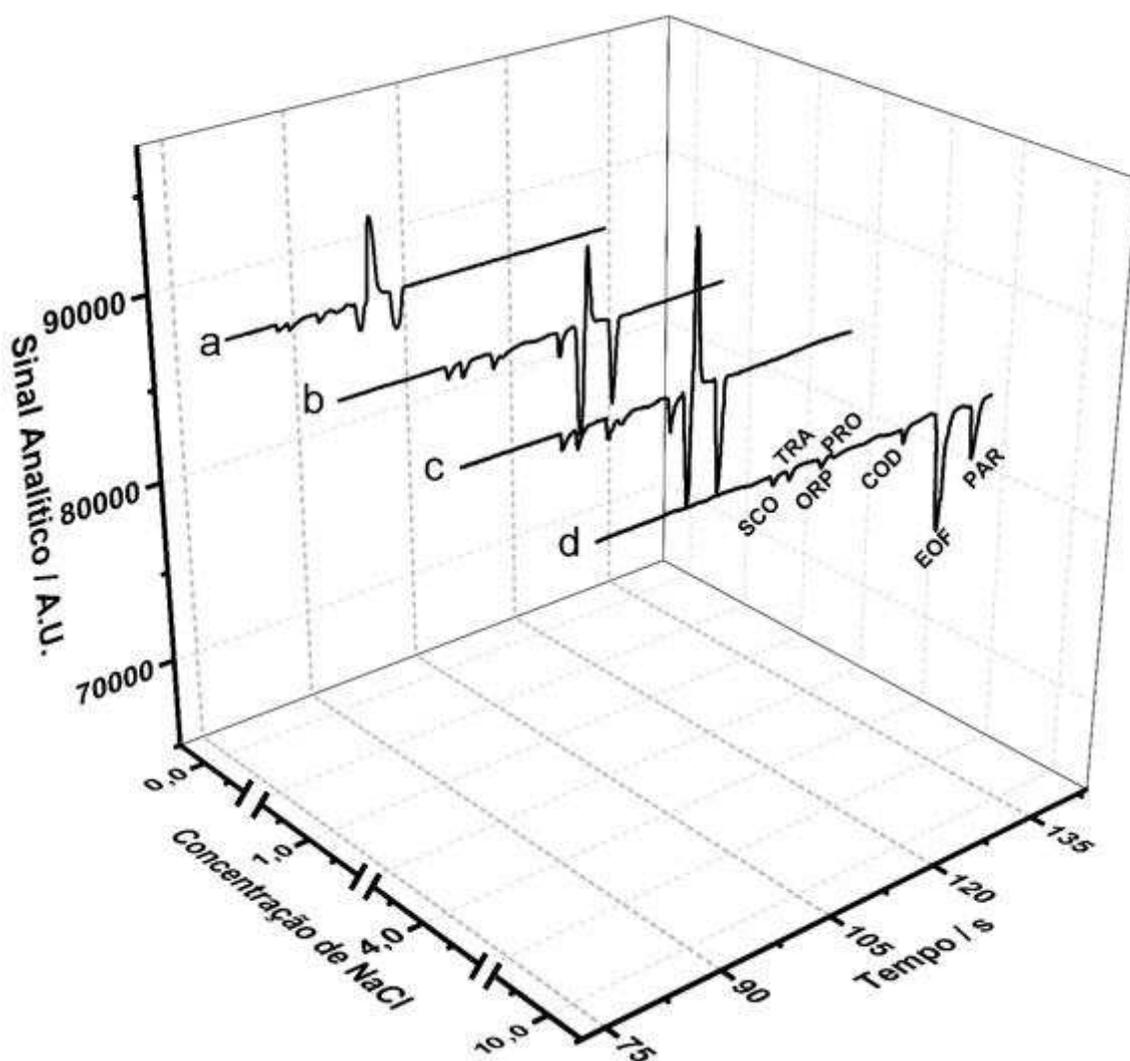


Fonte: Autor (2017).

Como o sinal analítico na Figura 25 fica prejudicado pela forma e escala em que estão apresentados os eletroferogramas, focando na diferença de condutividade do BGE pelo “gap” das linhas base, uma melhor apresentação destes resultados, focando

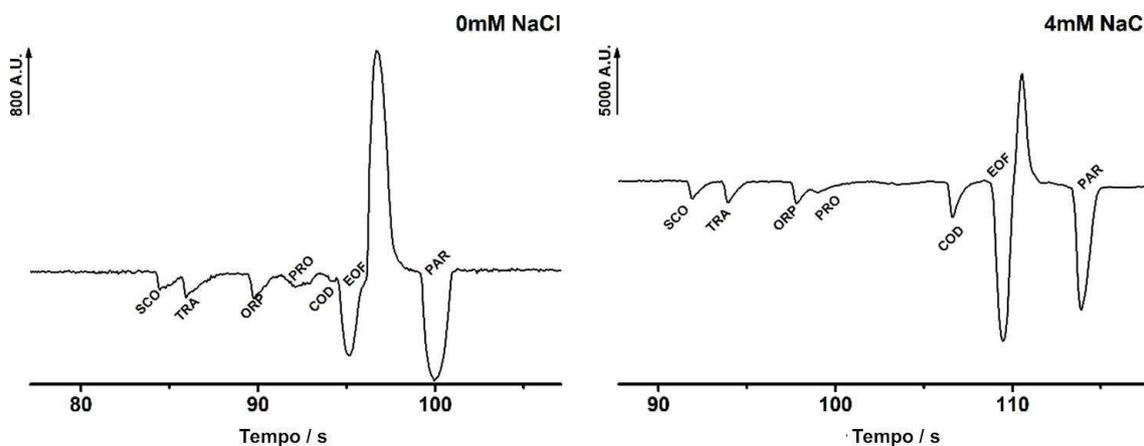
agora no sinal analítico fica apresentada na Figura 26 e ainda melhor na Figura 27, apenas para ausência e presença de 4 mmol L⁻¹ de NaCl no BGE.

Figura 26 – Eletroferogramas, em escala mais aproximada, obtidos pela injeção de soluções padrões contendo os analitos com adição crescente de NaCl na composição do BGE: a) 0 mmol L⁻¹, b) 1 mmol L⁻¹, c) 4 mmol L⁻¹ e d) 10 mmol L⁻¹. Outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

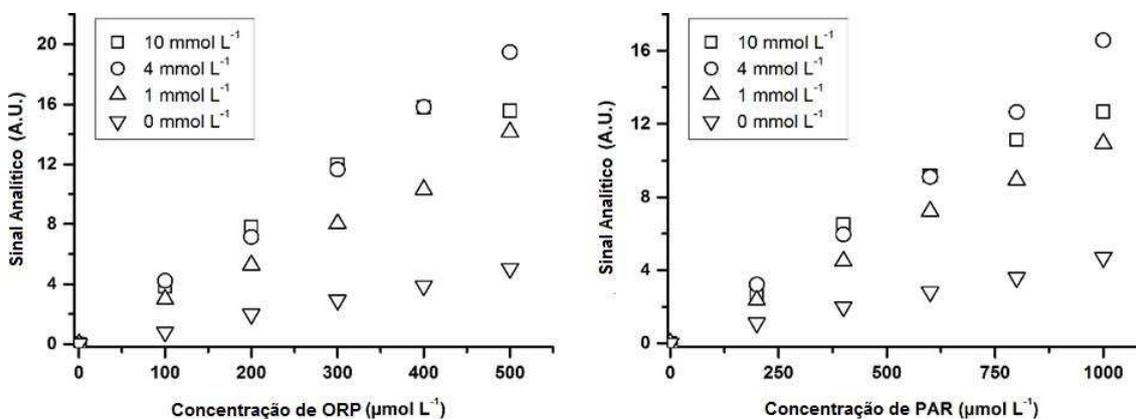
Figura 27 – Eletroferogramas, em escala mais aproximada, obtidos pela injeção de soluções padrões contendo os analitos na ausência (0 mmol L^{-1}) e na presença (4 mmol L^{-1}) de NaCl na composição do BGE. Outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

Ao se observar a Figuras 25 e 27, nota-se que há um incremento proporcional da mobilidade do EOF, bem como aumento da condutividade da solução. Esse incremento tanto na mobilidade quanto na condutividade faz com que se aumente o sinal analítico de cada um dos compostos, devido ao aumento da janela de mobilidade entre os analitos de baixa mobilidade e o BGE. Essa também é a justificativa pela melhora dos formatos dos picos de todos analitos, bem como uma melhora na resolução entre os sinais provenientes da SCO e TRA. Tal comportamento era esperado e fica melhor visualizado na Figura 27, na qual se apresenta uma melhora dos sinais analíticos quando da adição de NaCl ao BGE. Essa influência positiva com o uso do BGE salino foi confirmada e está apresentada na Figura 28, a qual mostra curvas de calibração obtidas para ORP e PAR usando 20 mmol L^{-1} de β -alanina e 4 mmol L^{-1} de NaOH (pH 9,6) como BGE sem (∇) e com adição de 1 (Δ), 4 (\circ), e 10 (\square) mmol L^{-1} de NaCl. Os valores dos coeficientes de correlação (r), bem como as inclinações das curvas de calibração (sensibilidade) para todos os analitos são apresentados na Tabela 8.

Figura 28 - Curvas de calibração obtidas para ORP (0, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PAR (0, 200, 400, 600, 800 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) usando 20 mmol L^{-1} de β -alanina e 4 mmol L^{-1} de NaOH (pH 9.6) como BGE sem (∇) e com a adição de 1 (Δ), 4 (\circ), e 10 (\square) mmol L^{-1} de NaCl.



Fonte: Autor (2017).

Ainda, assim como pode ser visto na Figura 28 para ORP e PAR, bem como na Tabela 8, para todos os outros analitos catiônicos (comportamento muito similar ao da ORP), a adição de 1 e 4 mmol L^{-1} de NaCl ao BGE causa um aumento na inclinação (sensibilidade) das curvas de calibração (Tabela 8). Já com a adição de concentrações ainda maiores de NaCl (10 mmol L^{-1}), além de não ter sido observada diferença significativa na inclinação da curva de calibração, um aumento no ruído da linha de base foi observado—acompanhado com uma queda na linearidade. Este fato se deve, provavelmente, a intensificação do efeito Joule, ocasionando uma mudança de temperatura no sistema ao se aumentar excessivamente a força iônica do BGE, além de modificar parâmetros como a viscosidade e o potencial zeta do BGE. Além disso, uma perda da linearidade foi observada na presença de 10 mmol L^{-1} de NaCl na composição do BGE. Deste modo, a melhor composição para o BGE foi considerada a de 20 mmol L^{-1} de β -alanina + 4 mmol L^{-1} de NaOH + 4 mmol L^{-1} de NaCl, com o valor de pH 9,6.

Tabela 8 - Mudanças observadas nos coeficientes de correlação e inclinações (slope) das curvas de calibração dos analitos alvos, pela adição de NaCl na composição do BGE.

		<i>NaCl</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaCl</i>	<i>NaCl</i>
		0 mmol L ⁻¹	1 mmol L ⁻¹	4 mmol L ⁻¹	10 mmol L ⁻¹
SCO	r	0,997	0,998	0,998	0,954
	Inclinação	3833 ± 165	10446 ± 290	16432 ± 550	17218 ± 873
TRA	r	0,996	0,998	0,989	0,980
	Inclinação	5285 ± 265	14844 ± 660	26839 ± 1424	30061 ± 1909
ORP	r	0,998	0,997	0,9989	0,971
	Inclinação	10096 ± 231	27278 ± 1037	39058 ± 912	33687 ± 3497
PRO	r	0,991	0,994	0,994	0,962
	Inclinação	4285 ± 110	9448 ± 524	19258 ± 1036	20113 ± 1866
COD	r	0,993	0,998	0,997	0,989
	Inclinação	9065 ± 301	24633 ± 999	31756 ± 1172	31005 ± 2012
PAR	r	0,998	0,998	0,989	0,969
	Inclinação	4529 ± 130	11023 ± 324	16340 ± 491	13097 ± 977

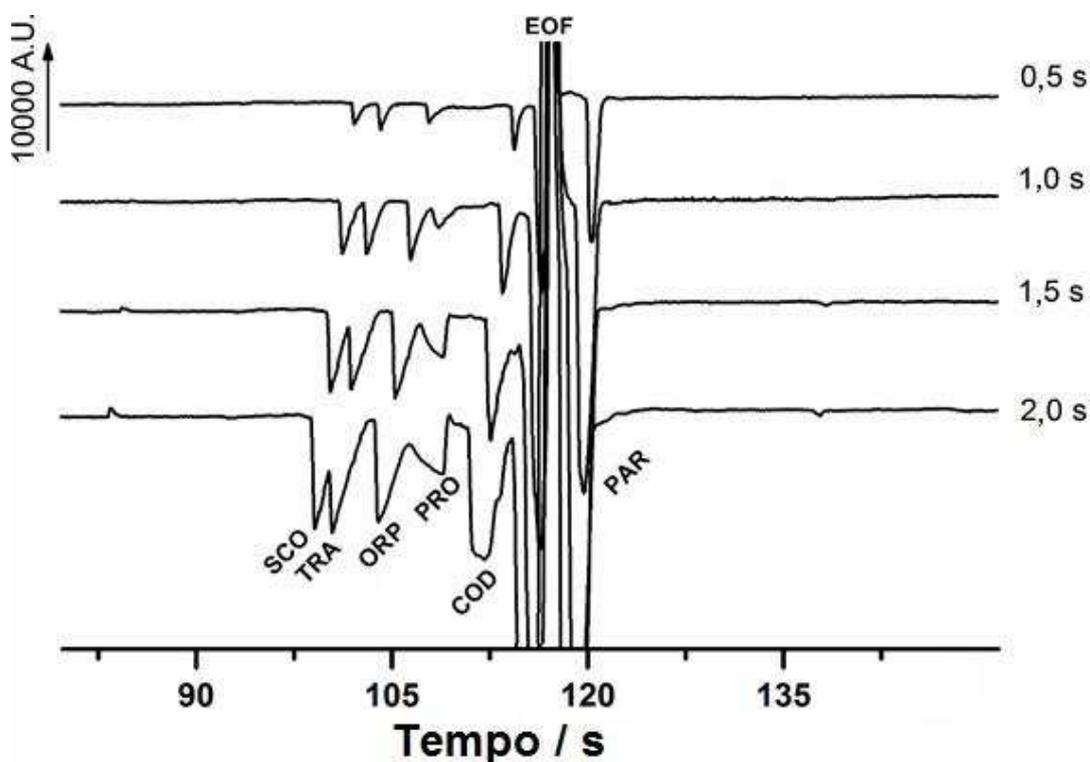
Regressão linear: Sinal Analítico = $a + b * [\text{analito}]$. Fonte: Autor (2017).

4.1.5 Avaliação das melhores condições dos parâmetros do método proposto

A proposta inicial deste trabalho foi desenvolver um método que fosse capaz de determinar todos os analitos alvo em uma única corrida eletroforética. No entanto, houve um inconveniente em comum a todos os BGE testados: as espécies PRO e ORP, devido a seus comportamentos e características similares (carga, massa molar e pKa), apresentaram tempos de migração muito próximos e, assim, co-migraram, como pode ser visualizado nos eletroferogramas já apresentados na Figura 27. Ainda com esperança de se utilizar o BGE selecionado como ideal para determinar simultaneamente os analitos aqui propostos com um único procedimento de calibração, realizou-se um estudo do

tempo de injeção (volume injetado hidrodinamicamente), tanto para obter um bom desempenho, com boa estabilidade (repetibilidade dos tempos de migração) e sensibilidade nos experimentos, tanto quanto na tentativa de se separar a co-migração do par PRO/ORP. No estudo do efeito do tempo de injeção hidrodinâmica, os seguintes tempos foram testados: 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 segundos com pressurização constante do sistema em 25 kPa. Os resultados deste estudo são apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo SCO, TRA, ORP, PRO, COD (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada) e PAR (1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Pressão constante de injeção: 25 kPa; demais condições experimentais: idem Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

Conforme é apresentado na Figura 29, e como era esperado, um aumento no tempo de injeção causa um incremento no tamanho do sinal analítico de todos os fármacos. Isso se deve ao fato de que ao ser acionada, a bomba que pressuriza o sistema para ocorrer a injeção hidrodinâmica por um período mais longo, maiores “plugs” de amostra são injetados dentro do capilar e assim, maior volume de solução contendo os analitos passam pelo detector. Apesar de congruentes com o esperado, não lograram sucesso as tentativas de, em baixos tempos de injeção, separar o par co-migrante

ORP/PRO. Não foram testados tempos inferiores à 0,3 segundos por limitações de repetitividade do equipamento em reproduzir, com precisão, a duração da aplicação da pressão. A injeção no tempo de 1,0 segundo assegurou o melhor comprometimento em termos de resolução na separação e razão sinal ruído.

Como a temperatura afeta a viscosidade do BGE, o equipamento utilizado neste trabalho é capaz de manter a temperatura controlada, através de uma micro controladora computacional associada a um sistema Peltier. Foram testadas 5 diferentes temperaturas do sistema (20,0; 22,5; 25,0; 27,5 e 30,0 °C) durante as análises com intuito de checar a influência deste parâmetro na robustez do método proposto. Deste estudo pôde-se concluir que existe uma faixa de aproximadamente 10 °C de temperatura (de 20 °C a 30 °C) que não causam influência nas medidas do método proposto. Embora as variações de temperatura testadas não terem apresentado mudança significativa durante as medidas, não afetando as resoluções entre os analitos, controlar o pH e o tempo de injeção de 1,0 segundos em pressão de 25 kPa é fundamental para a manutenção tanto da resolução quanto dos tempos de migração. As condições que foram otimizadas nesta etapa prévia do método proposto são apresentadas na Tabela 9 (n = 10).

Uma abordagem que não foi testada seria a opção de se aumentar o comprimento efetivo do capilar, no entanto, priorizando uma análise rápida, essa opção foi descartada para evitar um aumento no tempo de análise. Uma última opção para tentar melhorar a resolução entre as espécies (PRO e ORP) que apresentavam tempos de migração semelhantes poderia ser a elevação no potencial de separação. No entanto, essa não era uma abordagem disponível, pois há uma limitação do equipamento CE-C⁴D utilizado neste trabalho para a aplicação de potenciais de separação superiores a 25 kV, sem causar prejuízos ao próprio equipamento e à análise. Ao se realizar medidas com potencial de separação de 30 kV ocorreram distorções nos eletroferogramas, tornando-os pouco reprodutíveis e com linhas de base apresentando excesso de ruído, provavelmente causados pela fuga de alta tensão e/ou maior aquecimento do BGE no interior da coluna de sílica.

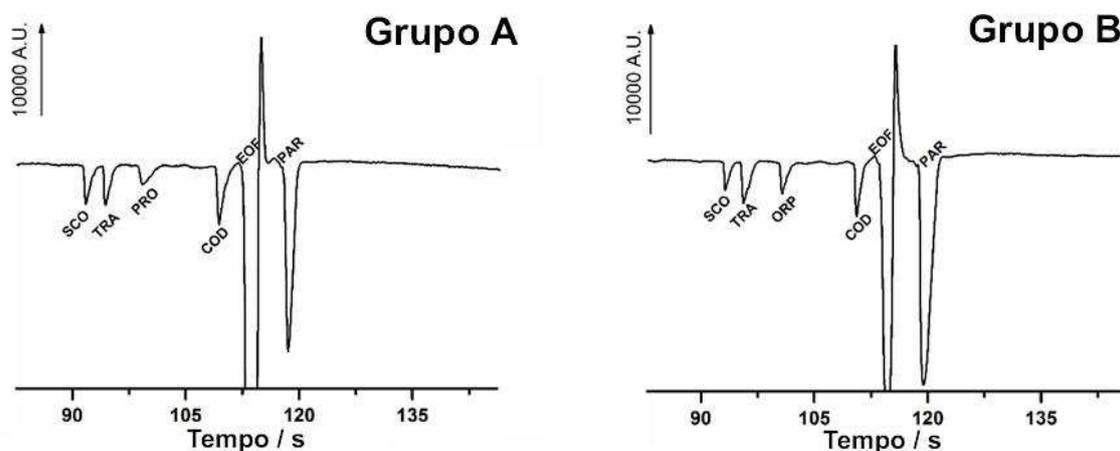
Tabela 9 - Condições otimizadas para o método de CE-C⁴D proposto.

Parâmetros	Faixa estudada	Valor ótimo
pH do BGE	9,4 – 9,7	9,6
Capacidade tamponante	A, B, C, e D ^a	β-alanina
Concentração de β-alanina ^b	10 – 30	20
Concentração de NaCl ^b	0 – 10	4
Tempo de injeção (s) a 25 kPa	0,5 – 2,0 s	1,0 s
Temperatura (°C)	20 – 30° C	25° C

^aA, B, C, e D: Borato, TRIS/TAPS, TEA, e β-alanina, respectivamente; ^bmmol L⁻¹
 Fonte: Autor (2017).

Como não foi obtido êxito em conseguir uma resolução adequada (>1,5) entre o par ORP/PRO, concluiu-se que amostras comerciais contendo ambos os pares de analitos PRO/PAR e ORP/PAR não podem ser analisadas na mesma curva de calibração. Essa afirmação é válida apenas nas condições avaliadas (tempo de injeção, pH e força iônica), por CE-C⁴D utilizando o mesmo procedimento de análise e/ou calibração pelo método proposto. Devido a esta limitação, foi proposto separar os analitos alvo deste estudo em dois grupos distintos: (A) SCO, TRA, ORP, COD e PAR; e (B) SCO, TRA, PRO, COD e PAR. Assim, praticamente todas as amostras comerciais podem ser analisadas empregando um único procedimento de calibração. No grupo A, todos analitos propostos são eficazmente determinados, no entanto, a amostra contendo o par de analitos PRO/PAR não pode ser analisada, enquanto no grupo B, amostras contendo o par ORP/PAR não podem ser analisadas. A Figura 30 apresenta os eletroferogramas característicos dos grupos A e B.

Figura 30 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de soluções padrão contendo: (A) 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCO, TRA, PRO, e COD e 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR; (B) 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SCO, TRA, ORP, e COD e 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR. BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina + 4 mmol L^{-1} NaCl + 4 mmol L^{-1} NaOH (pH 9,6) outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

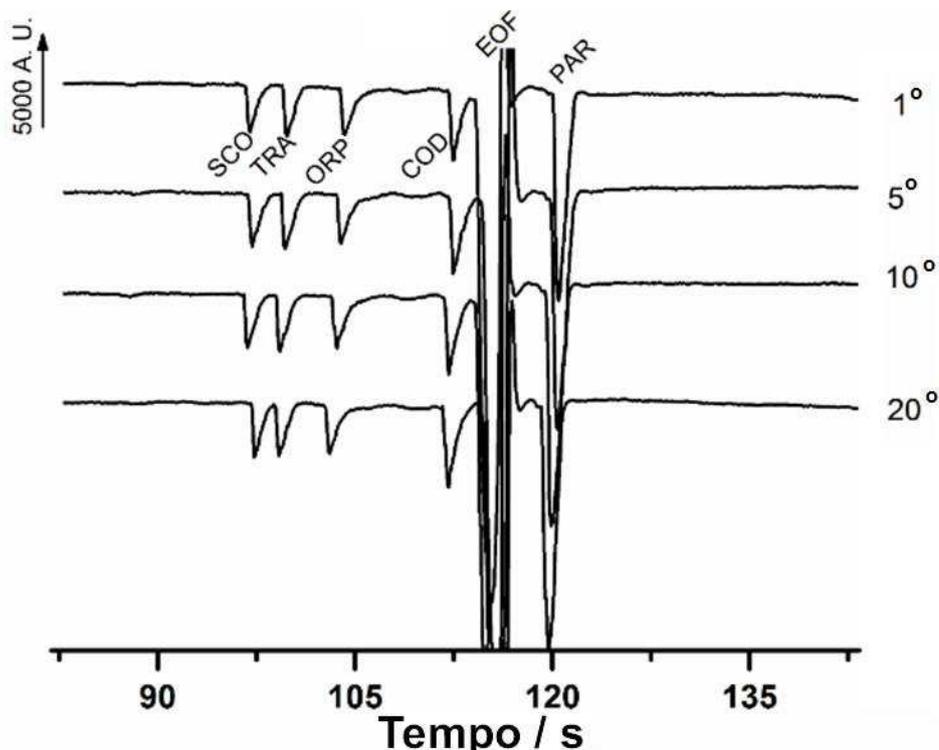
4.1.6 Estudo de repetibilidade

Após a definição das melhores condições experimentais em relação aos parâmetros mencionados anteriormente, procedeu-se com os estudos adicionais com intuito de realizar a validação do método proposto. O estudo de repetibilidade é apresentado na Figura 31 com a exposição de 4 eletroferogramas obtidos a partir de injeções sucessivas de uma solução padrão contendo os analitos alvos (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada um dos cátions e 1 mmol L^{-1} de PAR).

Como pode ser visualizado na Figura 31, respostas similares e estáveis ocorriam até cerca de 20 injeções sucessivas usando o mesmo BGE. Os resultados estatísticos calculados a partir dos dados da Figura 31 são apresentados adiante, em conjunto a vários outros resultados na Tabela 10.

Após essas 20 injeções, foram observadas algumas mudanças nos tempos de migração das espécies estudadas, especificamente uma redução na resolução entre SCO e TRA e entre o EOF e PAR. Essa limitação foi contornada facilmente com a substituição do BGE no interior do capilar ao se realizar o procedimento de “flush” (injeção de BGE por 3 minutos), com intuito de restaurar as condições iniciais e ideais para a análise.

Figura 31 - Estudo de repetibilidade: Eletroferogramas obtidos por 20 injeções sucessivas de solução contendo padrões de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SCO, TRA, ORP, COD e 3 mmol L^{-1} de PAR. Outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

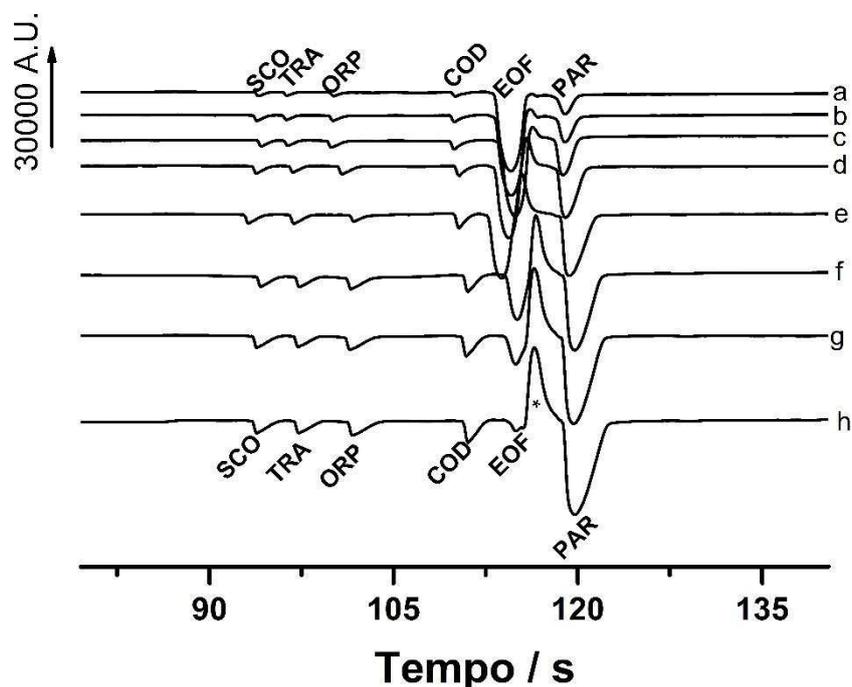
4.1.7 Estudo de linearidade

Outra otimização investigada foi o estudo da faixa linear de trabalho para os analitos alvo com intuito de se obter um coeficiente de correlação adequado ($\geq 0,99$) segundo ANVISA [304], de modo a ser aplicável à análise de amostras reais de fármacos em uma única corrida eletroforética. Nas amostras farmacêuticas disponíveis no mercado, a concentração de PAR é muitas vezes maior do que a dos outros analitos catiônicos presentes na formulação. Desta forma, a análise de amostras em uma única corrida eletroforética somente é possível caso exista uma relação linear entre a condutividade (parâmetro de leitura do detector) na faixa de concentração dos fármacos nas amostras. Concentrações muito diferentes podem ser encontradas nas amostras farmacêuticas entre os cátions orgânicos e o PAR (até 50 vezes maior do que os outros analitos).

Uma grande vantagem do uso da detecção C^4D é a de se ter uma resposta linear entre condutividade e uma ampla faixa de concentração, desta forma sendo possível se trabalhar, principalmente em valores mais elevados de concentração.

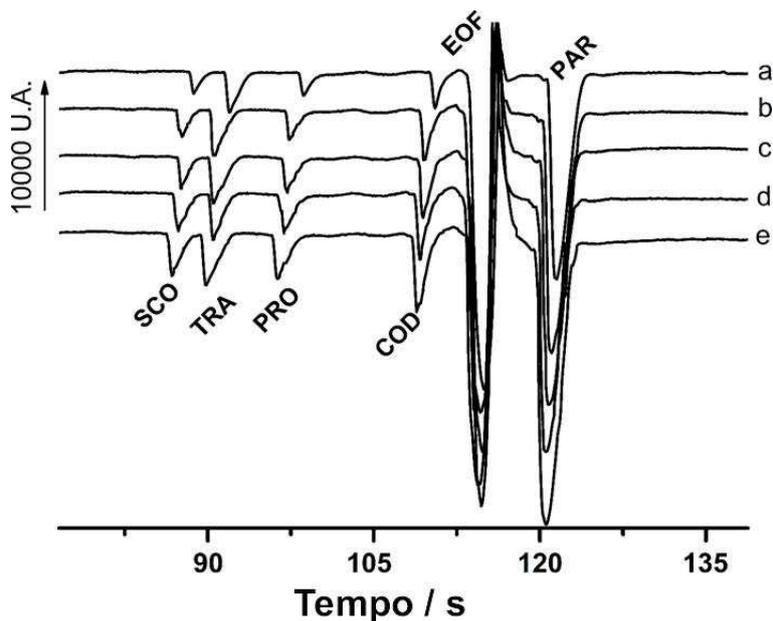
Utilizando os parâmetros otimizados que são apresentados na Tabela 9, uma boa relação linear para o PAR é observada desde 0,1 até 15 mmol L⁻¹ ($r = 0,989$). Quanto aos outros analitos alvo, a resposta linear foi observada na faixa entre 100 e 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r > 0,989$). Os eletroferogramas obtidos no estudo da faixa linear de resposta são apresentados nas Figuras 32 e 33.

Figura 32 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de solução padrão contendo SCO, TRA, ORP, COD (a-h: 100; 150; 200; 250; 350; 450; 550 e 650 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada), e PAR (a-h: 1,5; 2,0; 3,0; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 mmol L⁻¹). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

Figura 33 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de solução contendo SCO, TRA, PRO, COD (a-e: 100; 150; 200; 250 e 350 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada), e PAR (a-e: 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mmol L^{-1}). Outras condições, vide Figura 22.

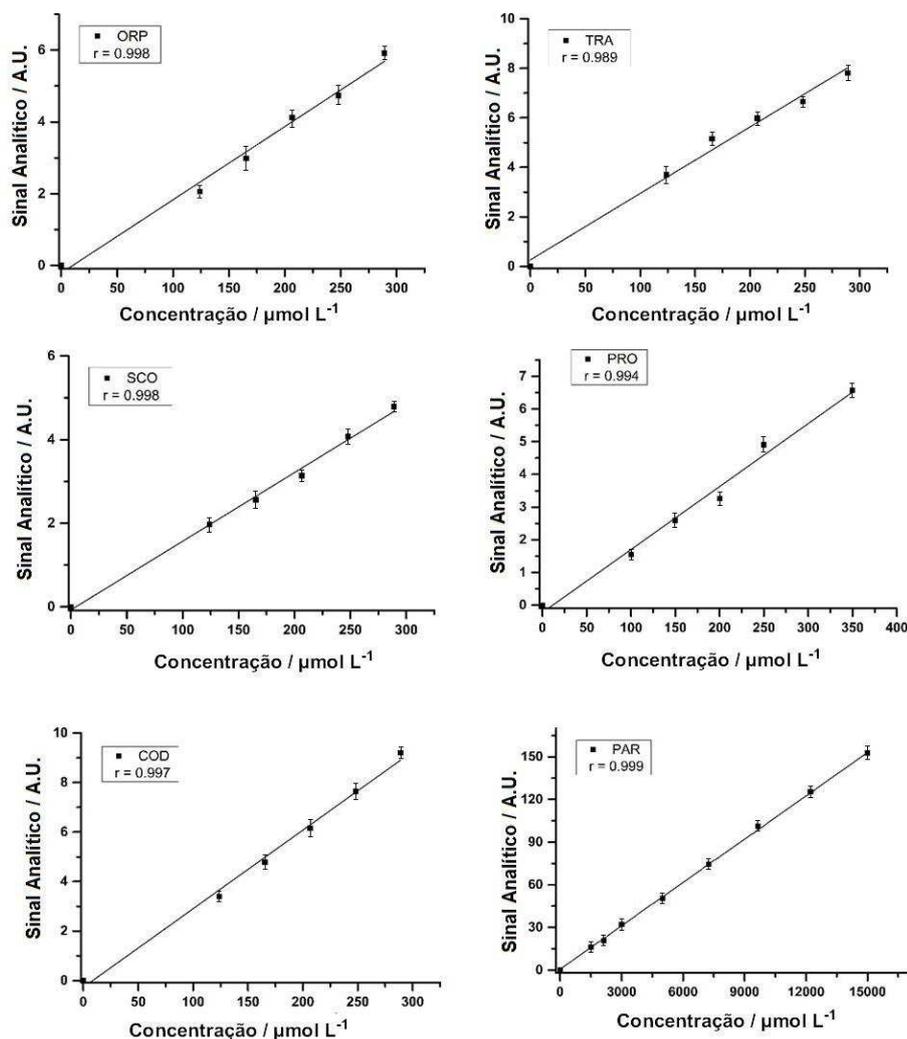


Fonte: Autor (2017).

Conforme pode ser observado nas Figuras 32 e 33, mesmo considerando a elevada concentração de até 50 vezes a mais de PAR em relação ao outro fármaco, amostras comerciais contendo essa diferença de concentração entre espécies podem ser analisadas em uma única corrida eletroforética. As características analíticas obtidas a partir do tratamento dos dados dos eletroferogramas mostrados nas Figuras 32 e 33 são apresentados na Tabela 10, junto a outras características do método proposto.

Na análise das amostras, uma faixa de concentração menor foi usada para construção das curvas de calibração. A linearidade observada para todos os analitos no intervalo de concentração estudado pode ser considerada adequada, segundo os parâmetros da ANVISA [304], uma vez que todos os coeficientes de correlação são superiores a 0,989 e são apresentadas na Figura 34.

Figura 34 - Curvas analíticas para todos os analitos (A) ORP; (B) TRA; (C) SCP; (D) PRO; (E) COD e (F) PAR, obtidas pelo método CE-C⁴D proposto (n=3).



Fonte: Autor (2017).

4.1.8 Avaliação do LOD e precisão

Considerando o que fora apresentado na introdução no que tange as formas de se obter os valores de LOD e que o método empírico apresenta valores de LOD menos supervalorizados, e deste modo mais realísticos, fundamentados em dados experimentais, essa abordagem foi a escolhida para ser utilizada neste trabalho. Deste modo, os resultados obtidos para LOD são apresentados na Tabela 10. Embora relativamente elevados, os LOD apresentados são adequados para que o método proposto possa ser empregado em análises de controle de qualidade de formulações farmacêuticas.

A precisão intra dias do método proposto foi examinada através de 20 injeções sucessivas de soluções padrões contendo todos os analitos e foi apresentada

anteriormente (Figura 31 - repetibilidade). Já a precisão inter dias foi avaliada com base na análise de soluções padrões contendo todos os analitos em cinco dias de trabalho distintos (n=5). Estes resultados também são apresentados na Tabela 10.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que o método proposto possui ajuste linear, entre a concentração estudada e o sinal analítico, com bons coeficientes de correlação ($> 0,989$), adequados valores de precisão intra dias (DPR $< 3,2$ %; n = 10) e inter-dias (DPR $< 5,5$ %; n = 10). Desta forma é possível concluir que o método CE-C⁴D aqui proposto possui como característica uma boa estabilidade.

A ampla faixa linear de resposta obtida para PAR (0,1 até 15,0 mmol L⁻¹) permitiu que as análises das amostras ocorressem em uma única corrida eletroforética (frequência analítica = 29 injeções h⁻¹) e com consumo mínimo de reagentes (3 mL de BGE por dia de análise), podendo ser considerado um método ambientalmente amigável.

4.1.9 Aplicação do método proposto

Nas análises químicas, principalmente em se tratando de amostras farmacêuticas contendo mais do que um princípio ativo, realizar todo procedimento analítico em uma única etapa é extremamente interessante por questões ambientais e econômicas. No entanto, devido à complexidade da composição das amostras em estudo neste trabalho (concentração de PAR superior ao outro princípio ativo – até 50:1), os métodos analíticos já preconizados poderiam encontrar dificuldades ao realizar tais análises em uma única etapa, podendo ser necessário uma etapa de pré tratamento de amostras ou pelo menos duas diluições distintas. Neste trabalho, a resposta linear do detector C⁴D para a ampla faixa de concentração de PAR (0,1 – 15,0 mmol L⁻¹) foi de fundamental importância para que a análise ocorresse em uma única etapa. O desempenho do método de CE-C⁴D foi avaliado, neste último quesito, através da análise de cinco amostras contendo diferentes conjuntos de fármacos com os parâmetros da calibração analítica realizada na Figura 34. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 10 - Características analíticas do método proposto (^aμmol L⁻¹, ^bRegressão linear: Sinal analítico = *a* + *b* [analito]).

	SCO	TRA	ORP	PRO	COD	PAR
LOD ^a	2,5	0,6	0,6	2,5	15,0	1,6
r	0,998	0,989	0,998	0,994	0,997	0,989
Inclinação (<i>b</i>) ^b	16432 ± 550	26839 ± 1424	39058 ± 912	19258 ± 1036	31756 ± 1172	16340 ± 491
Faixa linear ^a	100-350	100-350	100-350	100-350	100-350	100-15000
Intra-dia (%; n= 20)	1,8	2,7	2,5	2,2	2,5	3,2
Inter-dia (%; n = 10)	4,9	4,6	4,4	5,5	3,6	2,8
Resolução (n=10)	-	1,34 ± 0,03	1,91 ± 0,04	3,92 ± 0,06	3,77 ± 0,04	1,53 ± 0,03
Tempo de migração (s) (n=10)	94,2 ± 0,25	96,1 ± 0,35	101,1 ± 0,51	101,8 ± 0,29	111,4 ± 0,22	120,7 ± 0,36
Área do pico (A.U.) (n=10)	24309 ± 1012	23788 ± 667	25898 ± 1865	18518 ± 1030	38124 ± 2008	118275 ± 1894
Injeções h ⁻¹	29	29	29	29	29	29

O método foi avaliado ainda através da análise de amostras farmacêuticas reais e mediante ensaios de recuperação, os quais foram usados para aferir a exatidão (ANVISA [304]). Amostras foram adequadamente preparadas em uma concentração de $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito catiônico para serem analisadas antes e após adição de uma concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. No caso do PAR, o mesmo procedimento foi realizado, no entanto, a amostra foi preparada em uma concentração de 2 mmol L^{-1} e após adição de uma concentração conhecida de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os ensaios de recuperação apresentaram resultados com recuperações entre 94 e 104% para todos os analitos, desta forma evidenciando ausência de qualquer efeito de matriz e apresentando uma boa exatidão para o método proposto. Estes resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados (média \pm desvio padrão; $n = 3$) obtidos pela determinação dos princípios ativos contidos em cinco amostras farmacêuticas usando o método CE-C⁴D proposto.

Amostra	Analitos	Valores do Rótulo (mg/comprimido)	CE-C ⁴ D (mg/comprimido)	Erro (%)	Ensaio de Recuperação (%)
A	SCO	10	$9,6 \pm 0,3$	4,0	99 ± 3
	PAR	500	488 ± 6	2,4	96 ± 1
B	TRA	37.5	$39,0 \pm 1$	-4,0	104 ± 2
	PAR	325	331 ± 6	-1,8	97 ± 6
C	PRO	10	$9,7 \pm 0,6$	3,0	94 ± 3
	PAR	500	493 ± 6	1,4	101 ± 3
D	COD	30	$30,9 \pm 0,8$	-3,0	98 ± 6
	PAR	500	467 ± 7	6,6	99 ± 4
E	ORP	35	$35,7 \pm 2,3$	-2,0	100 ± 3
	PAR	450	463 ± 5	-2,8	99 ± 3

Erro: (Valores encontrado no rótulo) – (Valores obtidos pelo método proposto). Fonte: Autor (2017).

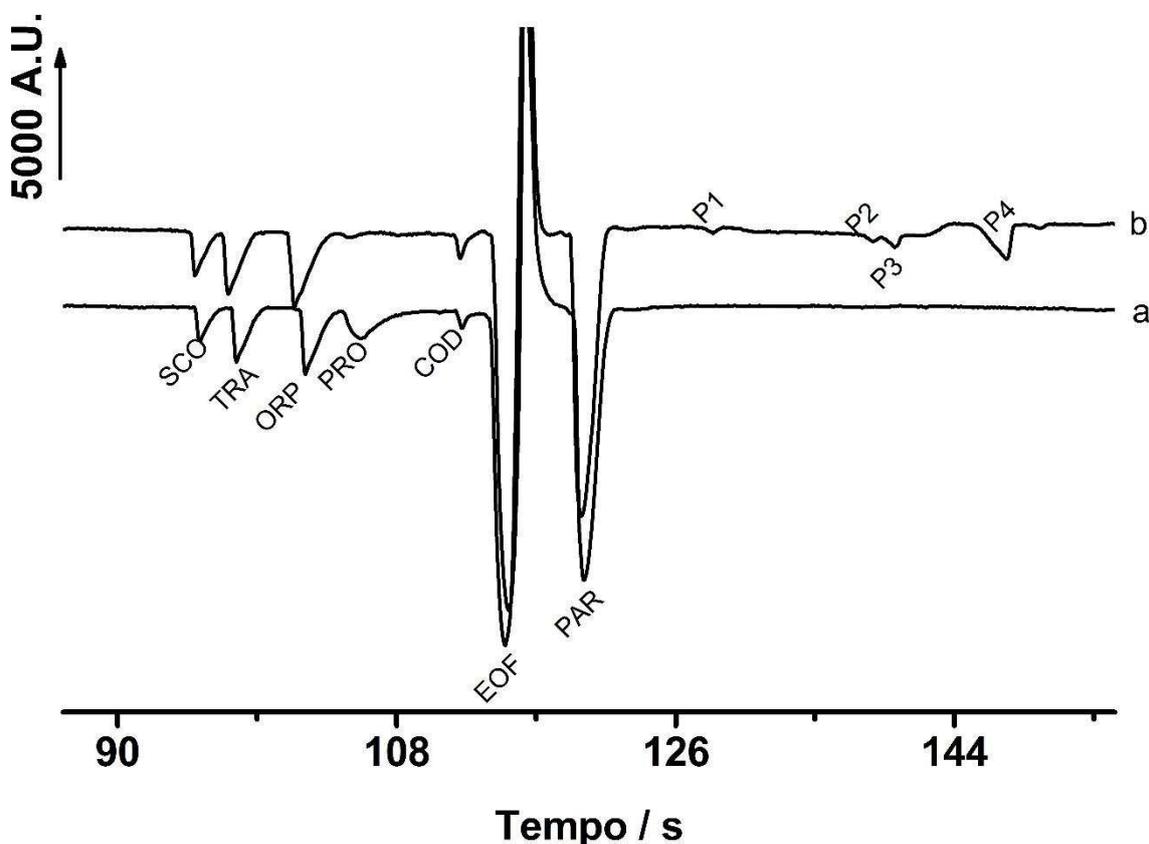
Conforme pode ser visualizado na Tabela 11, os resultados obtidos foram similares aos informados nos rótulos dos medicamentos, com diferenças entre os valores encontrados no rótulo e aqueles obtidos pelo método proposto menores do que 6,6%. Além disso, considerando a grande diferença entre a concentração de PAR e dos outros

princípios ativos, o resultado obtido nos ensaios de recuperação foram adequados para amostras farmacêuticas (94% – 104%), não sendo encontrados, desta forma, efeitos de matriz.

4.1.10 Estudo da degradação induzida via exposição solar

Um último experimento foi realizado para determinar a estabilidade de soluções contendo os cátions e o PAR à exposição solar. Uma mesma solução padrão, contendo um dos analitos nas proporções encontradas nos medicamentos comerciais, foi separada em dois fraconetes plásticos (“ependorf”), sendo uma exposta à radiação solar por 3h e a outra mantida na sombra. O resultado obtido pode ser visualizado na Figura 35.

Figura 35 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de duas soluções padrão contendo concentrações idênticas entre si dos fármacos em proporções comercialmente disponível, sendo uma delas mantida na sombra (a) e outra exposta por 3 horas à radiação solar (b). P1, P2, P3 e P4 são picos desconhecidos. Outras condições, vide Figura 22.

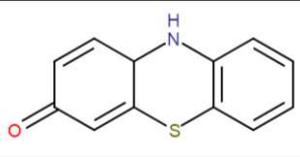
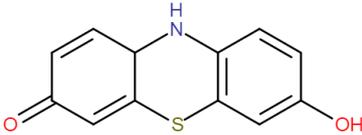


Fonte: Autor (2017).

Como pode ser notado na Figura 35, há uma queda do sinal analítico correspondente à PRO, bem como surgimento de quatro picos aniônicos desconhecidos P1, P2, P3 e P4. Ainda, como não foi notada redução significativa nos sinais analíticos dos outros analitos, há indícios que os mesmos não sofreram degradação por exposição à luz solar por 3 horas. Assim sendo, tais ânions desconhecidos P1, P2, P3 e P4 provavelmente são produtos de degradação originados da fotólise da PRO. Como em apenas 3 horas houve a degradação deste fármaco com aparecimento de pelo menos quatro novos compostos, fica aqui registrada a instabilidade da PRO à radiação solar, a qual também é mencionada na literatura [305, 306], bem como sua instabilidade à elevadas temperaturas [307]. Para confirmar tal hipótese, uma solução contendo cada fármaco individualmente foi exposta à mesma radiação, sendo notados, após análise no sistema CE-C⁴D, redução do sinal analítico, bem como aparecimento de novos picos, apenas para PRO.

Ao se analisar as estruturas que constam no trabalho de Underberg W. e colaboradores [307] e utilizando as ferramentas para calcular o provável valor de pKa [11] de tais produtos de degradação, teríamos como dois prováveis candidatos a serem dois dos ânions desconhecidos P1, P2, P3 e P4. Devido às suas características, tais candidatos poderiam ser os ânions provenientes da estrutura XIII [307], de nome fornecido pelo software “*10,10a-dihydrophenothiazin-3-one*”, com pKa 0,90 e fórmula molecular C₁₂H₉NOS [11]; e da estrutura XIV [307], de nome fornecido pelo software “*7-hydroxy-10,10a-dihydrophenothiazin-3-one*”, com pKa₁ 0,89 e pKa₂ 9,90 e fórmula molecular C₁₂H₉NO₂S [11], como podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 12 - Possíveis candidatos à produtos de degradação aniônicos da PRO.

Nome	Número do produto[307]	Estrutura molecular	pKa [11]
<i>10,10a-dihydrophenothiazin-3-one</i>	XIII		2,90
<i>7-hydroxy-10,10a-dihydrophenothiazin-3-one</i>	XIV		4,30 e 9,90

Fonte: Autor (2017).

Cabe ainda salientar que podem haver mais do que quatro produtos de degradação para este composto, após exposição ao sol, no entanto, tais sinais analíticos podem estar suprimidos do eletroferograma nas condições apresentadas devido, provavelmente, a três das situações: i) à provável similaridade entre a mobilidade destes outros produtos da fotólise, ii) serem neutros nestas condições e apresentarem tempos de migração junto ao EOF, e iii) estarem abaixo do LOD do método proposto, desta forma não sendo detectados por C⁴D.

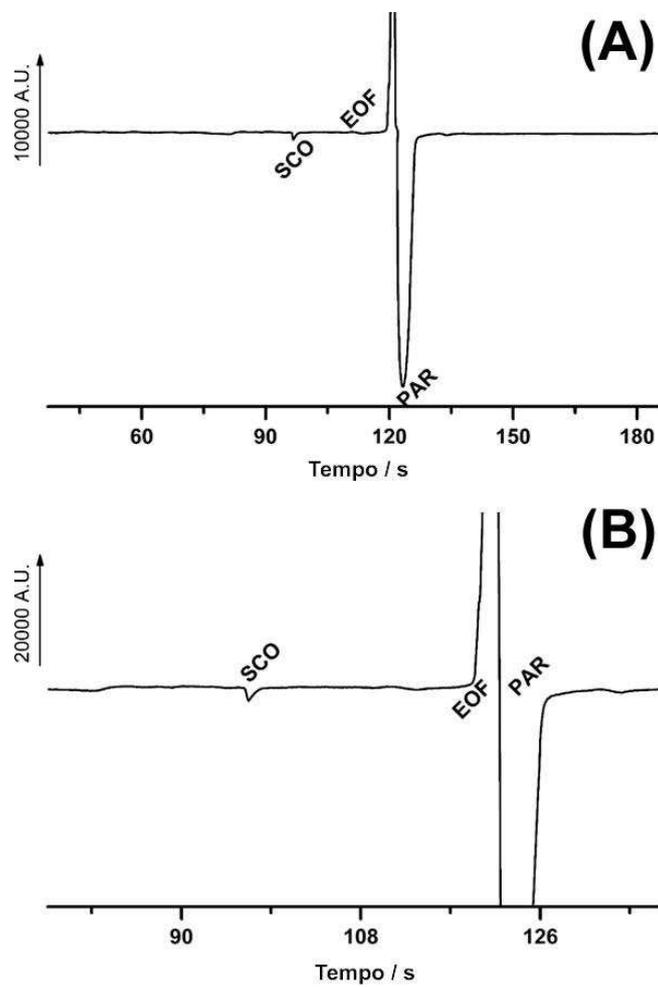
Tal afirmação também pode ser aplicada aos outros analitos, mesmo não havendo indícios de degradação dos outros compostos, os mesmos podem ter sofrido fotólise em escala menor que a PRO, e insuficiente para serem notados nos sinais analíticos dos eletroferogramas, devido ao LOD e aos desvios intrínsecos do método proposto, tanto para a redução dos sinais originais, quanto para o surgimento de novos sinais (provenientes de produtos de degradação). Cabe salientar que esta discussão se aplica para todas as técnicas analíticas, inclusive aquelas consideradas como as mais sensíveis, uma vez que tais sinais analíticos dependem da extensão da degradação e caso esta ocorra de forma discreta, nem mesmo o método com menores LOD e menores desvios será capaz de determinar se houve ou não degradação[229].

Em relação à provável composição e estrutura dos compostos P1, P2 P3 e P4, com intuito de verificar se alguns destes quatro poderiam ser as estruturas XIII e XIV apresentadas no trabalho de Underberg W. e colaboradores [307], bem como determinar se há modificação dos compostos presentes no tempo de migração do EOF indicando assim outros produtos da fotólise, seriam necessário o uso de outras técnicas analíticas, para aumentar a quantidade de informações, como por exemplo a abordagem utilizada para se determinar fenóis por CE-MS-C⁴D [232] e como muito bem apresentado na identificação de um novo subproduto da degradação da DIP, também utilizando-se CE-MS [229].

4.1.11 Apresentação do comportamento eletroforético das amostras

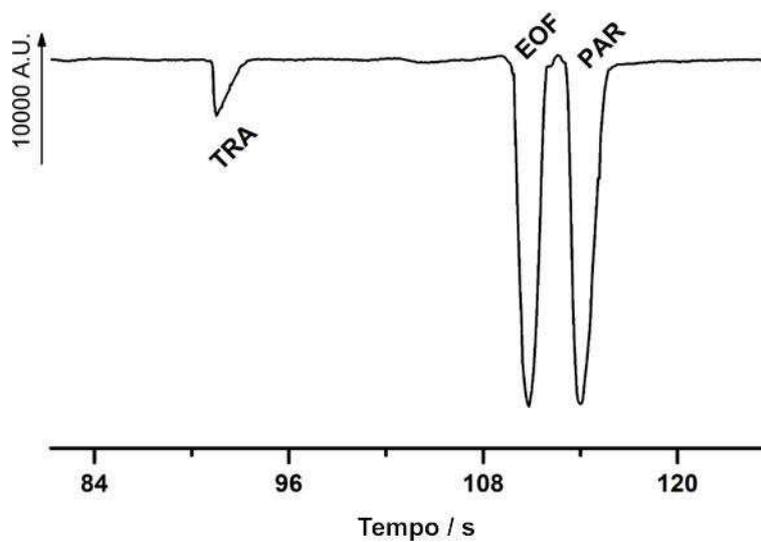
Ainda, eletroferogramas característicos das amostras são apresentados nas Figuras 36 a 39, para apreciação do sinal analítico das amostras.

Figura 36 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de SCO e PAR. Sem (A) e com (B) zoom para melhor visualização do sinal da SCO. Outras condições, vide Figura 22.



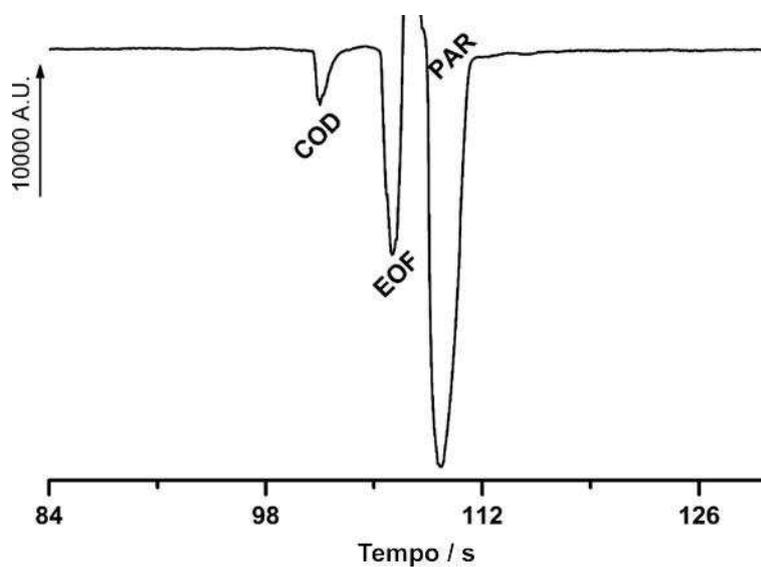
Fonte: Autor (2017).

Figura 37 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de TRA e PAR. Outras condições, vide Figura 22.



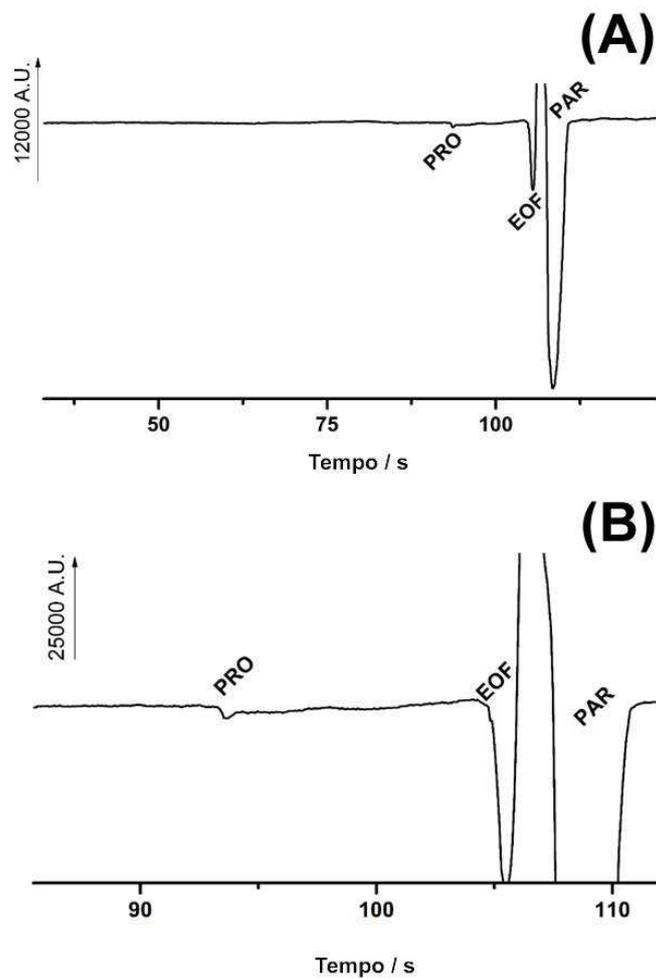
Fonte: Autor (2017).

Figura 38 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de COD e PAR. Outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

Figura 39 - Eletroferograma obtido a partir da injeção de uma solução contendo amostra de PRO e PAR. Sem (A) e com (B) zoom para melhor visualização do sinal da PRO. Outras condições, vide Figura 22.



Fonte: Autor (2017).

4.1.12 Conclusões parciais

Os resultados obtidos e expostos nesta seção demonstram que:

- ✓ O método proposto permite a determinação rápida e simultânea de PAR, COD, SCO, TRA, PRO ou de PAR, COD, SCO, TRA, ORP em formulações farmacêuticas, pois fornece limites de detecção e quantificação, seletividade e linearidade para as amostras avaliadas, robustez quanto à variação da temperatura, precisão (intra e inter dia) e exatidão (ensaio de recuperação) adequados para esta finalidade. Concordantes com esta afirmação, estão os resultados obtidos pelos ensaios de recuperação.
- ✓ A adição de NaCl à composição do BGE demonstrou ser uma estratégia eficiente para elevar a sensibilidade dos analitos que possuem baixa mobilidade/condutividade quando comparados à mobilidade/condutividade do BGE.
- ✓ O método empregado possui procedimentos simples, sem necessidade de preparo de amostra (apenas diluição), sem etapas prévias de extração ou derivatização, e sem se fazer necessário o uso de PI (normalmente requisitado em análises por CE).
- ✓ O método proposto apresenta uma elevada frequência analítica (29 injeções h^{-1}) se tornando ideal para análises rotineiras, com um consumo mínimo de solventes e reagentes não tóxicos, podendo ser considerado um método analítico verde (ECOfriendly) por reduzir, em uma grande escala, o custo e a geração de resíduos.

4.2 Parte II: Desenvolvimento de novos métodos para determinação simultânea de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas.

Com intuito de aumentar a aplicabilidade do sistema CE-C⁴D na análise de medicamentos comercialmente disponíveis que contém PAR e um dos princípios ativos que seguem: naproxeno (NAP), ibuprofeno (IBU), cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF), ácido ascórbico (ASC), foram desenvolvidos métodos de determinação simultânea do PAR com estes fármacos, de acordo com as combinações disponíveis em formulações comerciais.

Ao dar continuidade aos estudos de controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo PAR e outros princípios ativos, esse segundo capítulo difere do primeiro basicamente no que tange à substituição de cátions orgânicos por ânions orgânicos. No entanto, algumas abordagens e estratégias distintas tiveram que ser realizadas quanto à escolha do BGE, uma vez que foi escolhido se trabalhar com medicamentos que, além do PAR e outro princípio ativo aniônico, contém também cafeína (CAF) em sua composição. O fato da CAF estar presente em parte destas formulações, bem como o interesse em determinar este alcaloide, torna fundamental a presença de DMX [41] para sua determinação por CZE (vide introdução) e, deste modo, modifica a composição do BGE.

Cronologicamente, foi desenvolvido um método para determinação de PAR, CAF e IBU em parceria com o grupo do Prof. Dr. Wallans Torres da Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em um trabalho em parceria com o aluno de mestrado Sandro Chaves. Outra parceria dentro do próprio grupo do Prof. Dr. Eduardo Richter focou em desenvolver um método para determinação rápida de NAP, e por isso, esses ânions encontram-se em estudos separados dos demais. Com base nas experiências obtidas no trabalho realizado com os cátions e PAR e também com esses outros trabalhos em colaboração, seguiu-se a determinação dos outros ânions orgânicos que são encontrados em formulações comerciais junto ao PAR.

Estudos iniciais foram realizados usando o mesmo BGE empregado na determinação de PAR e cátions orgânicos, o qual logrou alguns resultados positivos. No entanto, devido à insolubilidade parcial de NAP nas condições do BGE, foram necessárias algumas adaptações no BGE quando da determinação deste fármaco. Como já

mencionado, outra distinção no BGE foi feita quando se trabalhou com a determinação de CAF, devido a necessidade da presença de DMX na composição do BGE.

4.2.1 Desenvolvimento de um método para determinação simultânea de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas contendo ibuprofeno (IBU) e cafeína (CAF).

Com intuito de se realizar a determinação simultânea de CAF, PAR e IBU por CZE, duas dificuldades tiveram que ser ultrapassadas.

A primeira limitação a ser contornada é o fato das moléculas de CAF serem neutras nas faixas de pH dos BGEs geralmente empregados em CZE, e, deste modo, migrarem dentro do capilar junto de outras moléculas neutras bem com da água (marcador do EOF), gerando assim, um único sinal analítico proveniente do somatório destas moléculas. Segundo nosso conhecimento, a determinação de CAF por CZE com detector C^4D é possível se o DMX for adicionado na composição do BGE para gerar um complexo aniônico com a CAF [41] e tornar a mesma influenciável ao campo elétrico do sistema, para que migre e se separe das outras moléculas neutras. Assim, se faz necessário o uso de no mínimo 10 mmol L^{-1} de DMX no BGE, uma vez que quantidades inferiores a esta concentração não apresentam bons resultados quanto à formação do complexo. O complexo carregado negativamente CAF-DMX possui uma baixa mobilidade e seu sinal analítico pode ser observado imediatamente após o EOF, se o sistema CE estiver sendo operado com -25kV de potencial de separação (lado da injeção) e com EOF normal (sem inversores de fluxo).

A segunda condição que teve de ser superada foi a necessidade de se usar um BGE com $\text{pH} > 9,5$ para deslocar o equilíbrio químico das moléculas de PAR ($\text{pK}_a \sim 9,5$) para sua forma aniônica. Nesta condição, às moléculas de IBU ($\text{pK}_a \sim 4,8$) apresentam-se na forma aniônica, e em soluções com pH acima de $\sim 6,8$; todo seu equilíbrio químico encontra-se deslocado para formação de espécies carregadas negativamente.

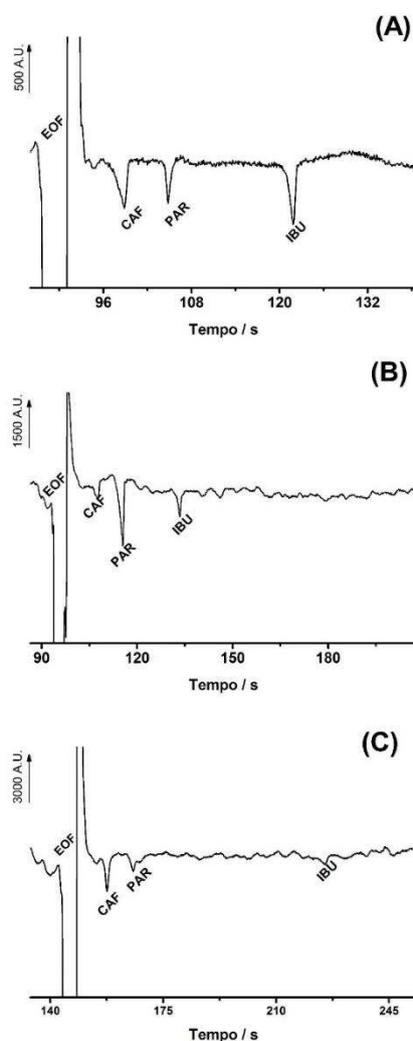
O ponto de convergência destas duas necessidades para esta análise ocorreu direcionando a decisão na composição do BGE. Considerando que o DMX ($\text{pK}_a \sim 3,9$) não apresenta a capacidade tamponante requerida em análises via CZE quando empregado

em BGE's com elevados valores de pH ($>9,5$), a adição de 10 mmol L^{-1} de β -alanina ($\text{pK}_a \sim 10,2$) foi empregada para alcançar as condições de tampão nesta faixa de pH.

4.2.1.1 Avaliação do BGE com distintas bases para correção de pH

Na etapa seguinte, para otimizar a composição do BGE (10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina), três soluções distintas foram testadas para ajustar o pH entre 9,5-11, sendo elas KOH, NH_4OH e LiOH, e tais resultados estão apresentados na Figura 40.

Figura 40 - Eletroferogramas de soluções padrão contendo CAF, PAR e IBU ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada) Em três composições distintas de BGE (pH 10,4): (A) 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + LiOH; (B) 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + NH_4OH ; e (C) 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + KOH. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica à 25 kPa por 1,0 s.



Fonte: Autor (2017).

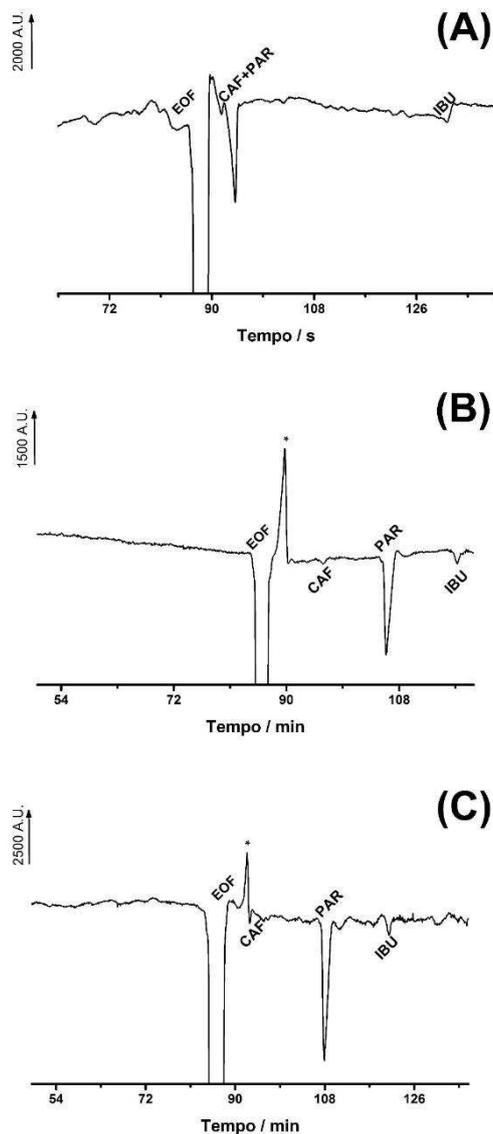
Os resultados com BGE de pH corrigido com KOH não foram satisfatórios devido ao pequeno sinal proveniente do IBU, como apresentado na Figura 40. Ainda, provavelmente, devido a sua menor mobilidade eletroforética/condutividade neste pH, o NH_4OH gerou menor SNR. Uma ainda melhor SNR foi obtida quando se utilizou quantidades adequadas de LiOH para ajustar o pH, portanto, a composição escolhida para o BGE foi 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + LiOH.

4.2.1.2 Avaliação do valor de pH

Como apresentado nos estudos com PAR e os cátions orgânicos, quando o BGE está com pH na faixa entre 9,5-10,0, o sinal analítico do PAR se apresenta na forma de um pico imediatamente após o EOF, com tempo de migração muito semelhante ao do complexo aniônico CAF-DMX. Desta forma, o pH do BGE teria que ser superior para que houvesse separação nos tempos de migração do complexo CAF-DMX e de PAR ($\text{pK}_a = 9,4$). Como mencionado, todas as moléculas de IBU ($\text{pK}_a = 4,8$) estão na sua forma negativa e, assim, essas variações de pH para faixas mais básicas não afetam seu tempo de migração. Estudos para otimização desta faixa de pH foram realizados pela injeção de solução padrão contendo $209 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, $15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF e $60,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU no BGE composto por 10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina com pH ajustado com LiOH, resultando em três BGE com pH 10; pH 10,4 e pH 10,8. O comportamento dos analitos alvo nestes BGE com diferentes valores de pH são apresentados nos eletroferogramas mostrados na Figura 41.

Como pode ser visualizado na Figura 41, à medida em que se eleva o valor do pH do BGE, o sinal analítico correspondente ao PAR se aproxima do sinal correspondente ao IBU. Ainda, com a elevação do pH, o pico do sistema migra em tempos muito próximos ao da CAF, desta forma em pH mais elevado há uma redução da resolução entre picos e da eficiência do método, além do aumento do tempo de análise. Desta forma, como temos novamente, neste trabalho, uma dependência da resolução dos picos (tempos de migração) com o valor do pH, um BGE com capacidade tamponante no pH 10,4 (10 mmol L^{-1} de DMX + 10 mmol L^{-1} β -alanina + 15 mmol L^{-1} LiOH) apresentou a resolução mais apropriada para os três analitos em questão.

Figura 41 - Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de solução padrão contendo $209 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, $15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e $60,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU em BGE com pH=10,0 (A); pH=10,4 (B); e pH=10,8 (C). *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.

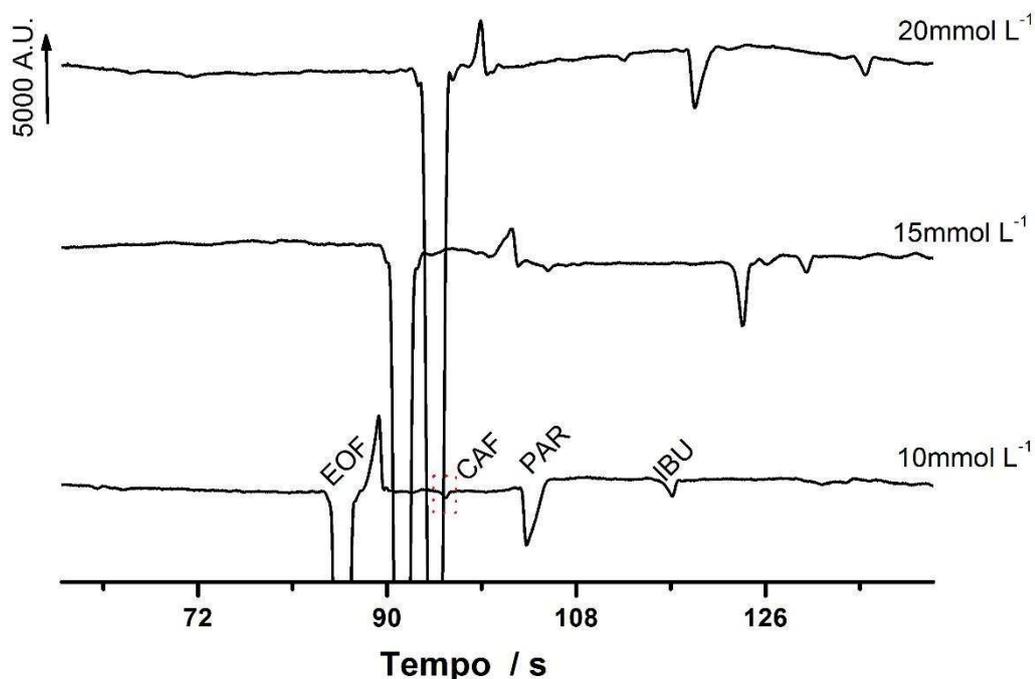


Fonte: Autor (2017).

4.2.1.3 Avaliação da concentração do DMX

Após os estudos para definir a composição e o pH do BGE, e ainda sabendo da necessidade de se ter, no mínimo, 10 mmol L^{-1} de DMX na composição do BGE, foram testadas composições de 10, 15 e 20 mmol L^{-1} de DMX no BGE proposto, sendo os resultados apresentados nos eletroferogramas da Figura 42.

Figura 42 - Influência da concentração de DMX (10, 20 e 30 mmol L⁻¹) no BGE: Eletroferogramas apresentando as injeções de solução padrão contendo 209 μmol L⁻¹ de PAR, 15,7 μmol L⁻¹ de CAF, e 60,7 μmol L⁻¹ de IBU. Outras condições, vide Figura 40.

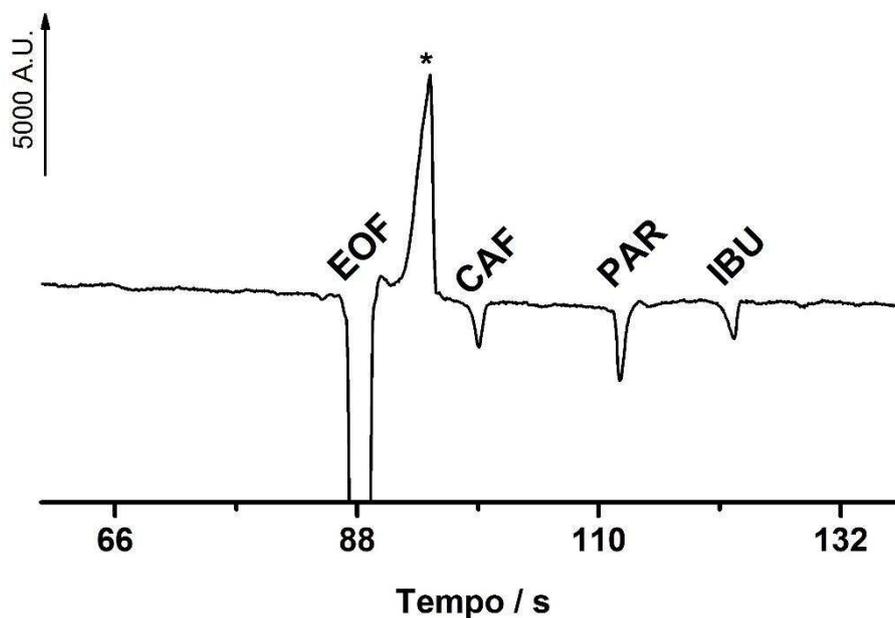


Fonte: Autor (2017).

Como pode ser visualizado na Figura 42, quando a concentração do DMX no BGE é aumentada, o tempo de análise também se eleva. Esse fato ocorre possivelmente pela redução no valor do potencial zeta com o aumento da força iônica, resultando assim em uma velocidade mais lenta do EOF. Com intuito de se gerar um método analítico de elevada frequência analítica, o BGE contendo 10 mmol L⁻¹ de DMX foi selecionado para os estudos subsequentes.

Com a definitiva composição do BGE, o comportamento dos analitos é apresentado no eletroferograma gerado pela injeção de uma solução padrão contendo CAF, PAR e IBU (1 mmol L⁻¹ de cada), constante na Figura 43.

Figura 43 - Eletroferograma contendo a injeção de uma mistura de solução padrão com CAF, PAR e IBU (1 mmol L^{-1} de cada) BGE: 10 mmol L^{-1} DMX, 10 mmol L^{-1} β -alanina e 15 mmol L^{-1} LiOH (pH = 10,4); *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 40.

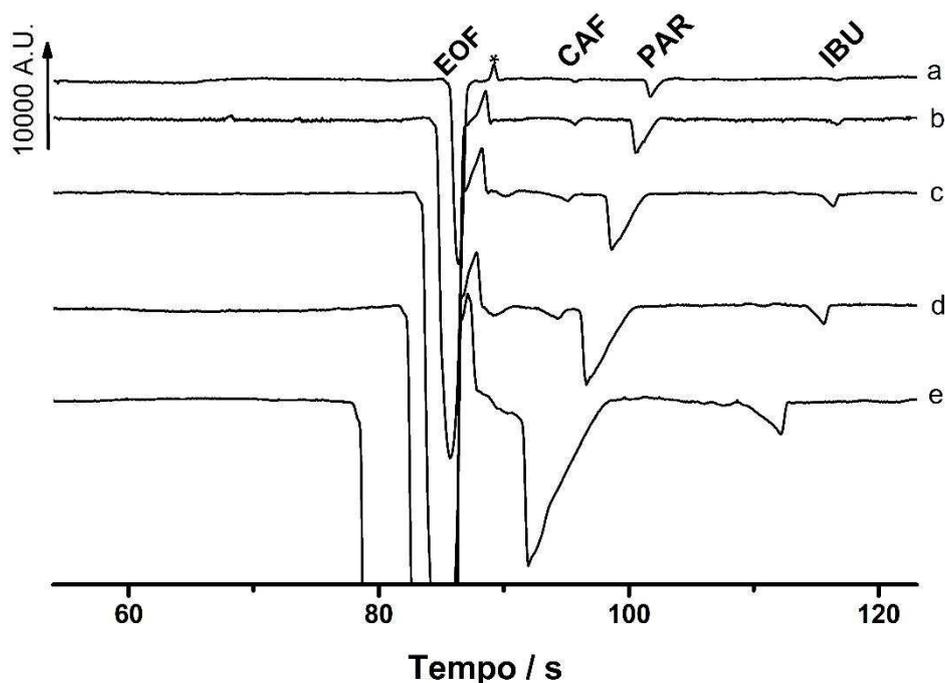


Fonte: Autor (2017).

4.2.1.4 Avaliação do tempo de injeção

Nessas condições, os tempos de migração foram de $1,65 \pm 0,02$, $1,87 \pm 0,01$, e $2,04 \pm 0,03$ minutos para CAF, PAR, e IBU, respectivamente. Com base nesses tempos de migração foi possível calcular e verificar que a resolução entre os picos de cada um dos analitos é mais que satisfatória (1,41; 5,77 e 4,27; para CAF, PAR, e IBU, respectivamente) uma vez que valores acima de 1,25 podem ser considerados aceitáveis [308]. Sendo que apenas a resolução calculada para CAF está abaixo do valor mínimo preconizado para uma separação completa entre dois analitos por cromatografia ($R=1,5$) [12]. Ainda com intuito de se obter o melhor desempenho do sistema para o método proposto, a influência do tempo de injeção hidrodinâmica foi testada, ajustando o equipamento com os tempos para injeção de 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0 segundos com pressurização constante do sistema em 25 kPa. Este estudo é apresentado nas Figuras 44 e 45.

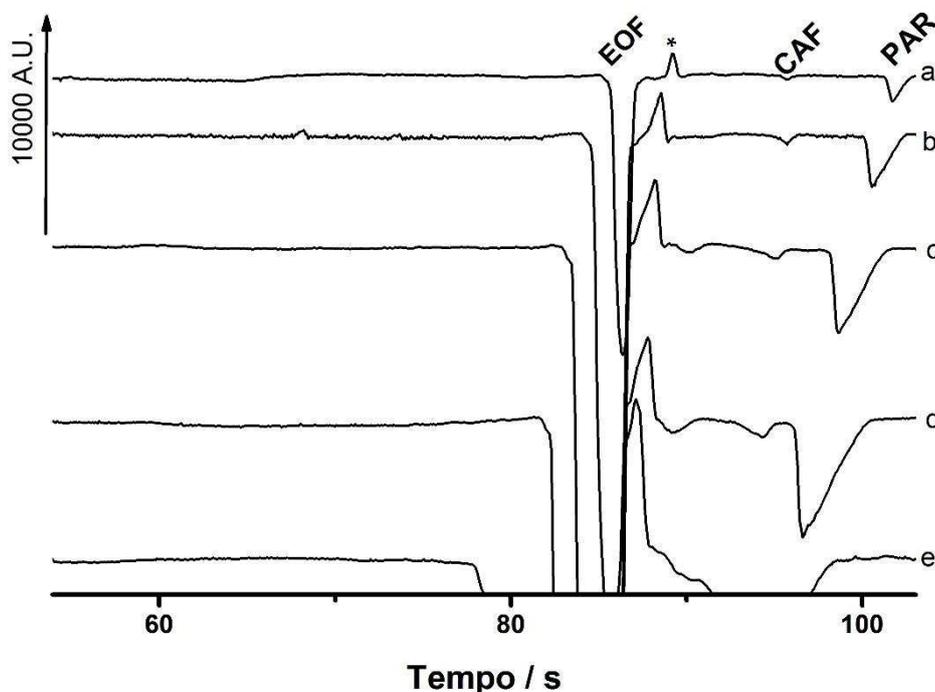
Figura 44 – Estudo do tempo de injeção: eletroferogramas obtidos pela injeção de solução padrão contendo $209 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, $15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e $60,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU em diferentes tempos de injeção de *a)* 0,3 s; *b)* 0,6 s; *c)* 1,0 s; *d)* 1,5 s; e *e)* 2,0 s; em 25 kPa de pressurização. *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.



Fonte: Autor (2017).

Conforme pode ser visualizado na Figura 44, a injeção no tempo de 1,0 s assegurou o melhor comprometimento em termos de eficiência na separação, resolução, e razão sinal ruído. Como já mencionado, não foram testados tempos inferiores à 0,3 s por limitações de reprodutibilidade do equipamento, e nem superiores a 2,0 s devido à co-migração entre CAF e PAR.

Figura 45 - Estudo do tempo de injeção: ampliação para melhor visualizar o sinal analítico da cafeína. Eletroferogramas obtidos pela injeção de solução padrão contendo $209 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, $15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e $60,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU em diferentes tempos de injeção de a) 0,3 s; b) 0,6 s; c) 1,0 s; d) 1,5 s; e e) 2,0 s; em 25 kPa de pressurização. *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.



Fonte: Autor (2017).

4.2.1.5 Avaliação da robustez em relação à temperatura do sistema

Para finalizar as otimizações antes se aplicar o método proposto em amostras reais, foram testadas 5 diferentes temperaturas do sistema (20,0; 22,5, 25,0; 27,5 e 30,0 °C) durante as análises com intuito de checar a influência deste parâmetro na robustez do método proposto. Novamente é possível concluir que existe uma faixa de temperatura entre 20 °C e 30 °C que pode variar e não causar influência nas medidas do método proposto.

Embora as variações de temperatura testadas não mudaram significativamente as medidas e resoluções entre os analitos, controlar tanto o valor do pH, quanto do tempo de injeção de 1,0 s (em pressão de 25 kPa) é fundamental para a manutenção dos tempos de migração dos analitos e, por conseguinte, da resolução. As

temperaturas testadas bem como os tempos de migração dos analitos são apresentadas na Tabela 13 (n = 3).

Tabela 13 - Comparação dos resultados (media \pm desvio padrão; n = 3) obtidos em cinco temperaturas distintas para os sinais analíticos em unidades arbitrárias (A.U.) e tempos de migração em segundos (s).

	CAF (AU)	CAF tempo de migração (s)	PAR (AU)	PAR tempo de migração (s)	IBU (AU)	IBU tempo de migração (s)
20,0 °C	6,4 \pm 0,9	96 \pm 1	90,9 \pm 1,2	114 \pm 1	14,5 \pm 0,4	121 \pm 1
22,5 °C	6,2 \pm 0,5	96 \pm 1	95,9 \pm 2,0	114 \pm 1	15,5 \pm 0,6	121 \pm 1
25,0 °C	5,2 \pm 0,3	96 \pm 1	86,9 \pm 1,1	114 \pm 1	14,8 \pm 0,7	123 \pm 1
27,5 °C	4,7 \pm 0,5	96 \pm 1	96,5 \pm 1,8	116 \pm 1	16,5 \pm 0,6	121 \pm 1
30,0 °C	4,3 \pm 0,5	96 \pm 1	93,9 \pm 2,3	114 \pm 1	15,9 \pm 0,8	122 \pm 1

Fonte: Autor (2017).

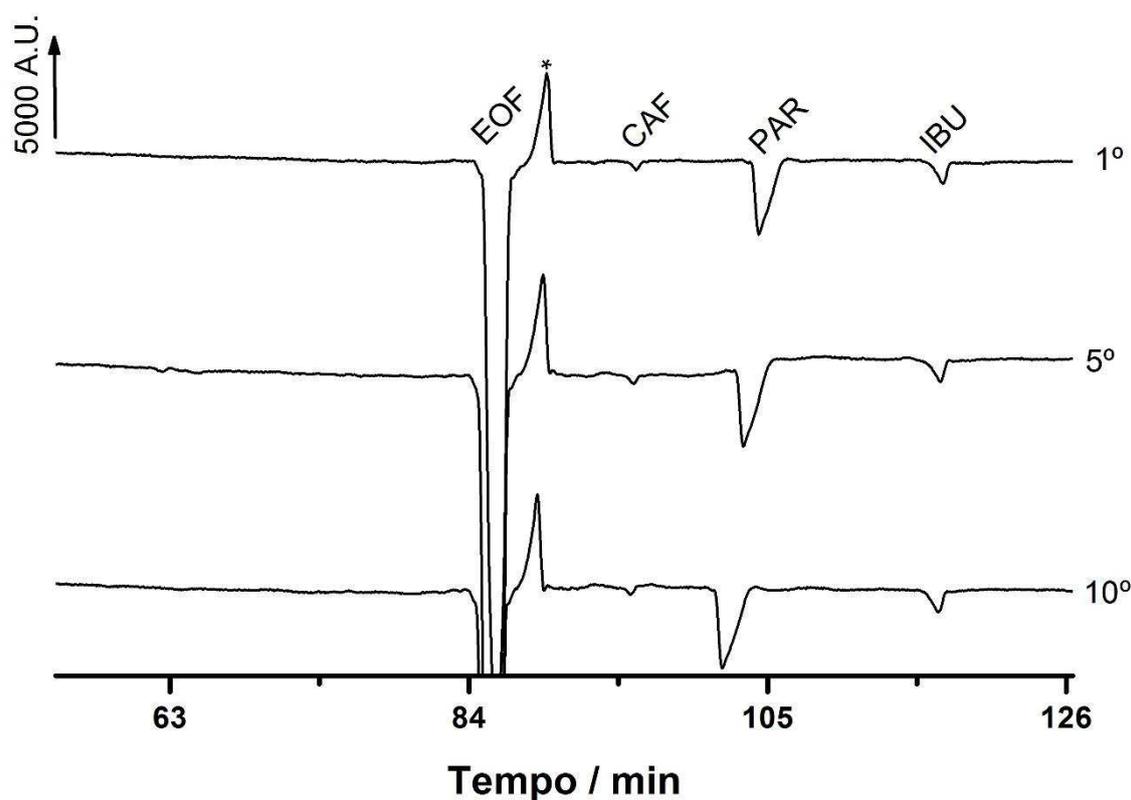
4.2.1.6 Avaliação das figuras de mérito

Após as já mencionadas otimizações do sistema e do BGE, estudos sobre precisão inter e intra dias, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e determinação, frequência analítica foram realizados com intuito de se validar o método proposto. Ainda foram realizados ensaios de recuperação. Por fim, foi feita a comparação entre o método proposto e o método usando HPLC desenvolvido em colaboração com o grupo do Prof Wallans, para avaliar a exatidão do método CE-C⁴D desenvolvido em relação às amostras de formulações farmacêuticas comerciais.

A solução do BGE determinada como adequada (10 mmol L⁻¹ DMX + 10 mmol L⁻¹β-alanina e 15 mmol L⁻¹LiOH (pH = 10,4) para este método é, como mencionado na seção 4.1 desta tese, preparada com facilidade antes de se iniciar as análises do dia, num volume final de 20 mL, sendo que desta porção apenas cerca de 3 mL são gastos

para se realizar 4 horas de operação. Respostas analiticamente similares e estáveis foram obtidas com inúmeras injeções (foram testadas 50 injeções) usando o mesmo BGE sem se fazer necessário a troca do BGE com acondicionamento/limpeza do capilar ou mesmo realizar o procedimento de acondicionamento (“flush”). O desempenho do sistema com os parâmetros otimizados é mostrado na Figura 46 com a exposição de três eletroferogramas (1^o, 5^o e 10^o) obtidos a partir de dez injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo CAF, PAR e IBU já nas proporções encontradas em amostras farmacêuticas (209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU) realizados no mesmo dia (intra-dias). Os dados obtidos desta figura são apresentados, junto à outras características do método proposto, na Tabela 14.

Figura 46 – Estudo de repetibilidade: eletroferogramas apresentando 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 209 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CAF, e 60,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de IBU para estudo de repetibilidade. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 40.



Fonte: Autor (2017).

Analogamente ao procedimento realizado no estudo com os cátions e PAR (seção 4.1), o limite de detecção foi estimado por via experimental (sem uso de cálculos tradicionais), aferindo o sinal analítico de soluções progressivamente menos concentradas e também são apresentados junto a outros dados na Tabela 14.

Os resultados apresentados na Tabela 14 indicam que o método proposto para determinação simultânea de CAF, PAR e IBU exibem boa resposta linear ($>0,99$), precisão adequada em se tratando tanto do estudo intra-dias (DPR $< 4,7\%$, $n = 10$) e inter-dias (DPR $< 5,6\%$, $n = 3$), e ainda bons valores resultantes do estudo de recuperação (92 – 107 %) indicando ausência de efeitos de matriz. É preciso salientar que os limites de detecção obtidos por CE-C⁴D são maiores do que os valores dos dois métodos publicados (Tabela 14) [153, 154]. Um elevado valor de LOD não causa uma limitação no método proposto, quando se tem como objetivo o controle de qualidade de amostras farmacêuticas, uma vez que o princípio ativo se encontra, geralmente, em concentrações mais elevadas na amostra e em tipos de matriz de baixa complexidade. No entanto, essa desvantagem se mostra uma limitação pelo fato de a detecção C⁴D não poder ser aplicada em amostras ambientais, em busca de traços dos analitos, e nem mesmo em amostras biológicas, sem antes se realizar um processo de “*clean-up*” e uma pré-concentração, no entanto, esta dificuldade também pode ser aplicada à outros métodos com outros tipos de detecção.

Por outro lado, o método CE-C⁴D (~ 27 injeções h^{-1}) possui uma grande vantagem sobre o HPLC (~ 6 injeções h^{-1}) em relação à velocidade de análise. Enquanto o método CE-C⁴D proposto utiliza apenas 3 mL de um total de 20 mL preparados de BGE, em solução aquosa para realizar, com repetibilidade a determinação dos analitos, o método HPLC, utiliza na composição do gradiente de sua fase móvel, aproximadamente 204 mL de acetonitrila no mesmo período de tempo em seus experimentos. Esse fato acarreta outras vantagens como a redução drástica do consumo de reagentes e solventes em até 10 vezes, e assim implicando em uma menor geração de resíduos com certa toxicidade.

Tabela 14 – Comparação entre os resultados e características analíticas obtidos durante a comparação do método proposto, e de métodos publicados anteriormente para determinação simultânea de CAF, PAR e IBU.

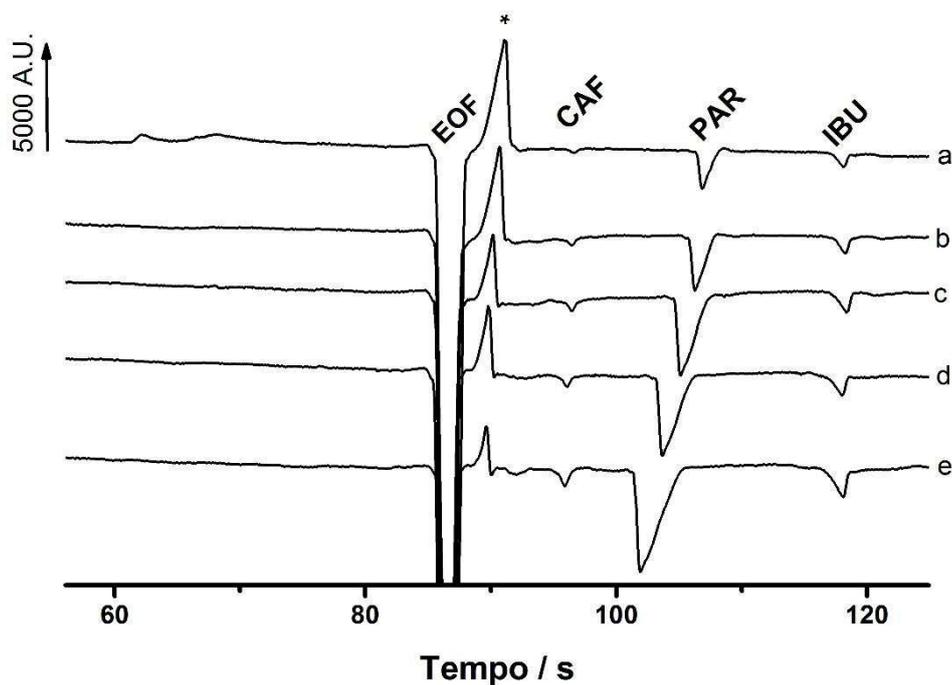
	CE-C ⁴ D			HPLC [154]			Espectrofotometria [153]		
	CAF	PAR	IBU	CAF	PAR	IBU	CAF	PAR	IBU
LOD ^a	39,2	31,9	48,7	0,7	4,4	3,4	1,0	0,4	0,8
r	0,997	0,999	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998
Faixa linear	300-2000	400-8000	400-2500	6-62	83-836	24-242	5-93	4-73	5-116
Intra-dia (%; n=10)	4,7	1,9	2,3	0,4	0,5	0,5	-	-	-
Inter-dia (%; n = 3)	5,6	2,0	5,6	1,5	1,9	1,2			
Ensaio de recuperação (%)	94	97	107	92	96	103	102	99	100
Injeções h ⁻¹	27	27	27	6	6	6	-	-	-

^aμmol L⁻¹. Fonte: Autor (2017).

4.2.1.7 Estudo da linearidade e calibração analítica

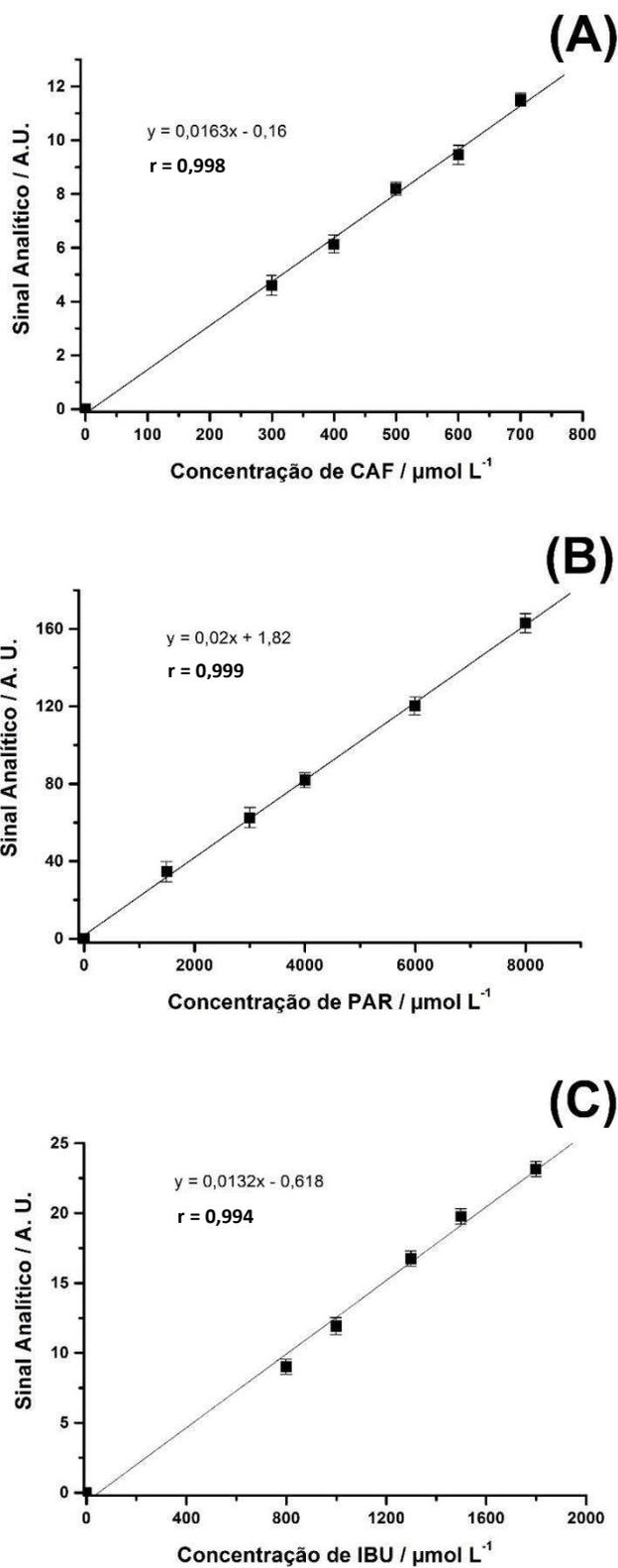
Amostras comerciais foram analisadas pelo método CE-C⁴D proposto para determinação simultânea de CAF, PAR e IBU. Uma faixa intermediária de concentração foi escolhida dentro da faixa linear de trabalho para a construção de curvas de calibração para as três substâncias alvo. Os eletroferogramas obtidos no estudo da faixa linear pela injeção (n=3) de cinco soluções com concentrações crescentes de CAF (300; 400; 500; 600 e 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (1500, 3000, 4000, 6000 e 8000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e IBU (800, 1000, 1300, 1500 e 1800 $\mu\text{mol L}^{-1}$) são apresentados nas Figuras 47 e 48.

Figura 47 – Eletroferogramas apresentando injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de CAF (300; 400; 500; 600 e 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (1500, 3000, 4000, 6000 e 8000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e IBU (800, 1000, 1300, 1500 e 1800 $\mu\text{mol L}^{-1}$). * pico do sistema. *pico de sistema. Outras condições, vide Figura 40.



Fonte: Autor (2017).

Figura 48 - Curvas de calibração obtidas para CAF (A), PAR (B) e IBU (C) com dados da Figura 47 (n=3).

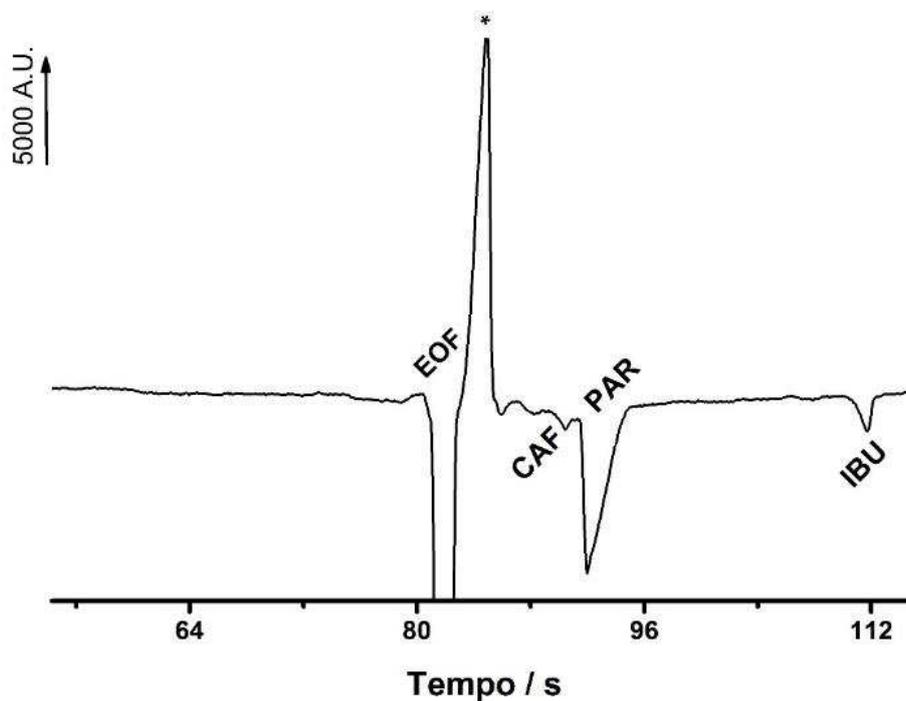


Fonte: Autor (2017).

4.2.1.8 Aplicação do método proposto em amostras reais e comparação dos resultados via HPLC

Como pode ser visualizado nas Figuras 47 e 48, as curvas de calibração para os três analitos alvo apresentaram boa linearidade, resultando em valores satisfatórios de coeficiente de correlação ($r > 0,994$). A partir desta calibração, foram realizadas análises de amostras comerciais de medicamentos. A Figura 49 apresenta o perfil de um eletroferograma obtido pela injeção de uma solução preparada a partir de uma amostra farmacêutica comercial. Os resultados obtidos são comparados aos obtidos por HPLC para a mesma amostra, e apresentados na Tabela 15.

Figura 49 - Eletroferogramas obtido pela injeção de uma solução preparada a partir da amostra farmacêutica comercial contendo CAF, PAR e IBU em sua formulação, apropriadamente diluída; *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 40.



Fonte: Autor (2017).

Tabela 15 - Comparação dos resultados obtidos, em mg/comprimido (média \pm SD; n = 3) para determinação simultânea de PAR, CAF e IBU em amostras farmacêuticas pelo método CE-C⁴D proposto e por HPLC [154].

Amostras	Analitos	Valores do rótulo	HPLC-DAD	CE-C ⁴ D
1	CAF	30	32,1 \pm 0,3	29,5 \pm 0,6
	PAR	500	508 \pm 5	494 \pm 4
	IBU	200	213 \pm 2	204 \pm 1
2	CAF	30	32,6 \pm 0,3	30,2 \pm 0,2
	PAR	325	328 \pm 3	324 \pm 4
	IBU	250	249 \pm 2	247 \pm 1

Fonte: Autor (2017).

Os valores estatísticos provenientes do teste F não revelaram uma diferença significativa entre os desvios padrão (SD) de ambos os métodos a um nível de confiança de 95%. Nos dois casos, o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}=19,0$. Já os resultados obtidos a partir da comparação das médias pelo teste t Student, calculado em nível de confiança de 95%, demonstraram valores inferiores ao valor crítico teórico de 4,303 para n=2, comprovando a similaridade dos resultados obtidos com os dois métodos (HPLC e CE-C⁴D proposto).

4.2.2 Desenvolvimento de método para determinação de PAR e ânions orgânicos presentes em formulações farmacêuticas contendo cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF), ácido ascórbico (ASC) e naproxeno (NAP).

Após vislumbrar a potencialidade de, tanto o equipamento CE-C⁴D, quanto do método desenvolvido nos trabalhos anteriores (PAR e 5 cátions – seção 4.1, e a parte inicial da seção 4.2, relativa a determinação de CAF + PAR + IBU), outros analitos aniônicos foram alvo de desenvolvimento de um novo método. Sendo os novos analitos aniônicos que acompanham o PAR: cafeína (CAF), ácido acetilsalicílico (AAS), dipirona (DIP), piridoxina (PIR), diclofenaco (DCF), ácido ascórbico (ASC) e naproxeno (NAP).

Os valores de pKa de interesse para NAP, AAS, DIP, PIR (anfótero), ASC e DCF (pKa's: \approx 4,2; 3,4; -1,4; 5,6 e 9,40 (anfótero); 4,36 e 11,6; e 4,00; respectivamente) podem ser explicados pelo comportamento destes compostos em solução. Com exceção da PIR, a qual apresenta comportamento anfótero (pKa₁ 5,6 e pKa₂ 9,4), todas as outras espécies, completamente carregadas ou não, possuem caráter aniônico em soluções com pH > 7 e aumentam gradualmente sua carga negativa à medida em que o pH é elevado (exceto a CAF). Assim, com intuito de se realizar a determinação destas moléculas por CZE, o ideal seria utilizar pH acima de 7. No entanto, conforme já discutido, devido ao comportamento do PAR (pKa 9,5), para determinar esse novo conjunto de ânions orgânicos se faz necessário o uso de BGEs com pH's maiores que 8,5.

Em estudos voltados para definir um valor ideal de pH no qual não ocorra a co-migração dos analitos aniônicos, foi encontrada como condição ideal um BGE com pH por volta de 10,5. Assim garantindo um menor tempo de análise e, ao mesmo tempo, mantendo equilíbrio ácido-base deslocado para que praticamente todas moléculas de PAR (pKa 9,5), e também dos ânions orgânicos com comportamento de ácido mais fracos, estejam na sua forma aniônica.

Como é mencionado na literatura [27], o NAP possui baixa solubilidade em água, deste modo, se faz necessário adição de um solvente orgânico como o etanol nas soluções padrões e amostras, bem como no BGE, quando da necessidade de se determinar esse analito. Outro fator a ser considerado neste grupo de fármacos aniônicos é que as formulações disponíveis comercialmente contendo PAR e DIP, PAR e AAS, e ainda PAR

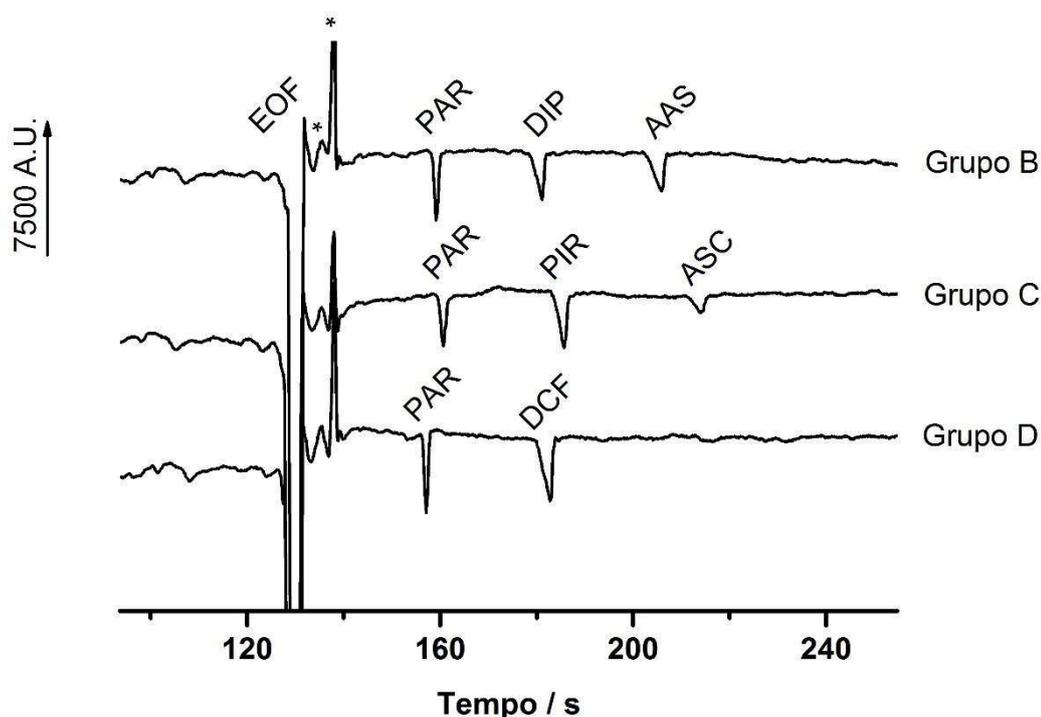
e DCF podem ser encontradas formuladas em conjunto à CAF, a qual desempenha o papel de adjuvante, nestes casos.

Devido à diversidade de composição destas amostras, a diferença de concentração entre os analitos, e especialmente, ao comportamento similar de alguns ânions, o qual acarreta à co-migração de algumas espécies, como DIP, PIR e DCF, bem como AAS e ASC (vide Figura 50), se fez necessário a separação dos analitos de interesse em 04 grupos distintos:

- Grupo A: PAR +NAP +AAS (baixa solubilidade em meio aquoso)
- Grupo B: PAR + DIP + AAS (na presença ou não de CAF)
- Grupo C: PAR + PIR + ASC
- Grupo D: PAR + DCF (na presença ou não de CAF)

Inicialmente, estudos na ausência de CAF foram realizados para prover a opção ao analista de escolha do método mais adequado, caso o intuito seja de determinar fármacos em amostras sem CAF. Diversas soluções tampão na região de pH 10,5 (ácido bórico / borato, $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$, CHES / LiOH, CHES / NH_4OH , e β alanina / NaOH) foram testadas como BGEs. Entre estas, novamente a solução composta por 10 mmol L^{-1} de β alanina, com pH corrigido até 10,5 com NaOH apresentou os melhores resultados considerando características como resolução, sensibilidade, frequência analítica e estabilidade de linha base. Em estudos iniciais realizados com o objetivo de investigar o comportamento dos novos analitos, foram injetados no sistema CE- C^4D uma solução padrão contendo PAR e os outros analitos aniônicos alvos. Os eletroferogramas obtidos são apresentados na Figura 50. Os resultados para o Grupo A serão apresentados separadamente.

Figura 50 - Comportamento eletroforético dos ânions: Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo os analitos aniônicos do grupo B (PAR+DIP+AAS), grupo C (PAR+PIR+ASC) e grupo D (PAR+DCF). BGE: 20 mmol L⁻¹ β-alanina + 4 mmol L⁻¹ NaCl, pH ajustado com NaOH; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Todas medidas foram realizadas usando um capilar de sílica fundida (50 μm i.d.) com 40 cm de comprimento efetivo (50 cm de comprimento total). *pico de sistema.



Fonte: Autor (2017).

Resultados iniciais demonstraram que a técnica de CE-C⁴D tem potencialidade para determinação simultânea de PAR e outros fármacos presentes em diferentes formulações farmacêuticas comerciais. O BGE proposto apresentou resultados consideravelmente rápidos (tempos curtos de aproximadamente 200 s por análise com resolução adequada), mesmo não sendo utilizada a estratégia convencional de inversão do EOF (mais rápido para ânions) e tendo grande potencial para ser aplicado a outras formulações contendo PAR.

Mais uma vez, como não é possível determinar todos os analitos em uma só corrida, o método não pode ser considerado simultâneo para todos ânions orgânicos alvo. No entanto, a necessidade de uma análise simultânea que abarcasse todos analitos não é

trivial, uma vez que estão separados em grupos os compostos que normalmente estão presentes em uma única formulação comercial.

Uma ressalva deve ser feita novamente neste ponto do trabalho em relação a opção de não inversão do EOF. Neste estudo optamos em determinar os ânions migrando contra o EOF normal, prática pouco comum quando se preza a frequência analítica. Isso se deve ao fato de quando o inversor de fluxo (por exemplo CTAB) é adicionado ao tampão, o sinal analítico para DCF não é detectado, devido possivelmente a uma interação entre o surfactante (responsável pela inversão do EOF) e as moléculas de DCF [251]. Outro ponto que também impede a inversão do EOF é a presença de CAF em algumas amostras. Devido à intrínseca necessidade de se utilizar DMX na composição do BGE, torna-se incompatível adicionar CTAB ou qualquer outro surfactante no mesmo, uma vez que a presença de surfactantes alteram as constantes de formação do complexo DMX-CAF e, assim, também suprimem o sinal analítico do complexo [41].

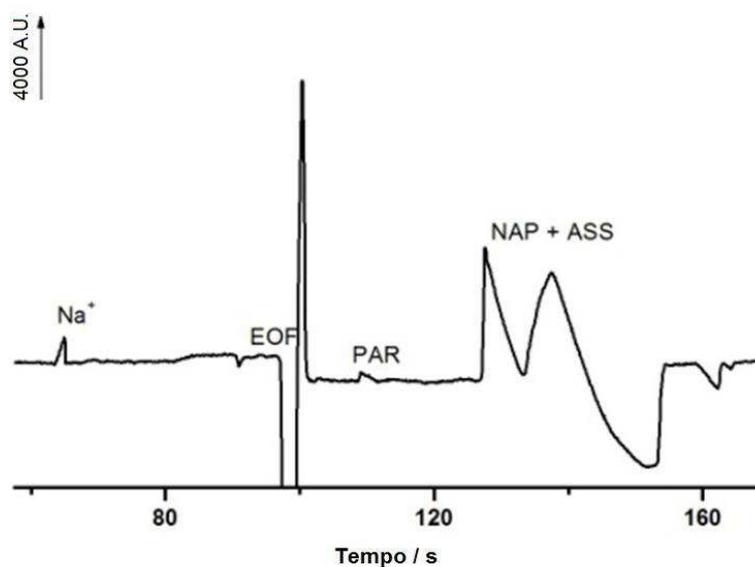
Deve ainda ser salientado que os estudos com cada grupo de analitos foi realizado com um intervalo de tempo relativamente grande, devido à defeitos no equipamento e também dedicação a outros projetos durante o doutorado. Assim, valores como tempo de migração e outros resultados esperados podem apresentar pequenas discrepâncias entre si, ao longo da tese.

4.2.2.1 Método para determinação dos ânions do Grupo A: PAR+NAP +AAS

4.2.2.1.1 Avaliação do BGE com diferentes bases

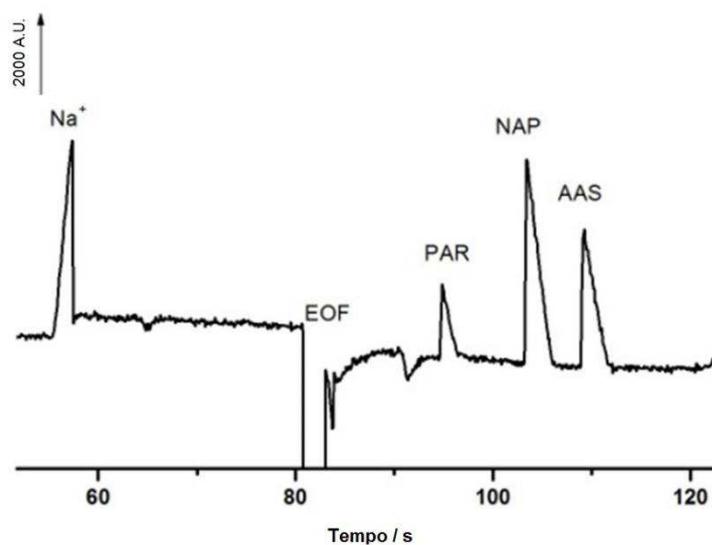
Com intuito de se otimizar o BGE para determinação dos analitos presentes no Grupo A, três bases distintas (LiOH, NH₄OH e KOH – vide Figuras 51, 52 e 53, respectivamente) foram testadas para ajustar o pH até 10,5 de uma solução de β-alanina 20 mmol L⁻¹. Todas as injeções neste estudo foram realizadas hidrodinamicamente por 1s (25kPa), com potencial de separação de +25kV (no lado da injeção), EOF normal e com soluções padrão de 500 μmol L⁻¹ de cada um dos analitos (PAR, NAP e AAS).

Figura 51 - Eletroferograma apresentando comportamento da solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} β alanina com pH ajustado em 10,5 com adição de LiOH (10% etanol v/v). Outras condições, vide Figura 50.



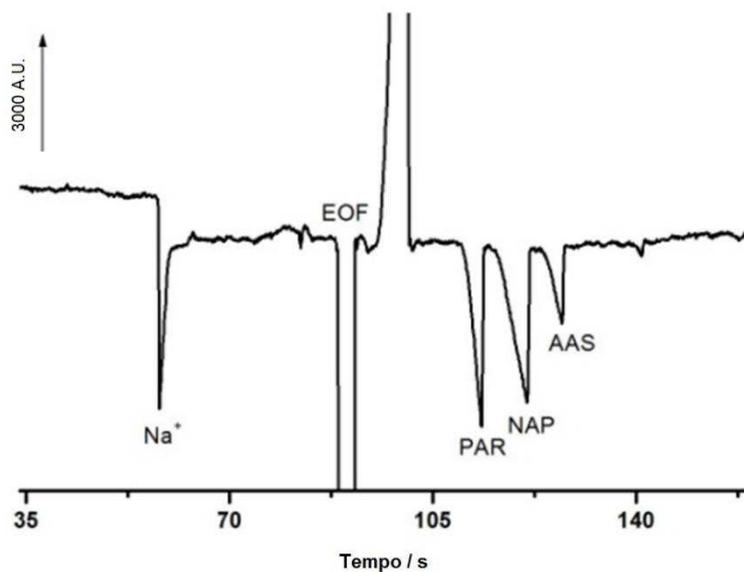
Fonte: Autor (2017).

Figura 52 - Eletroferograma apresentando comportamento da solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} β alanina com pH ajustado em 10,5 com adição de NH_4OH (10% etanol v/v). Outras condições, vide Figura 50.



Fonte: Autor (2017).

Figura 53 - Eletroferograma apresentando comportamento da solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} β alanina com pH ajustado em 10,5 com adição de KOH (10% etanol v/v). Outras condições, vide Figura 50.



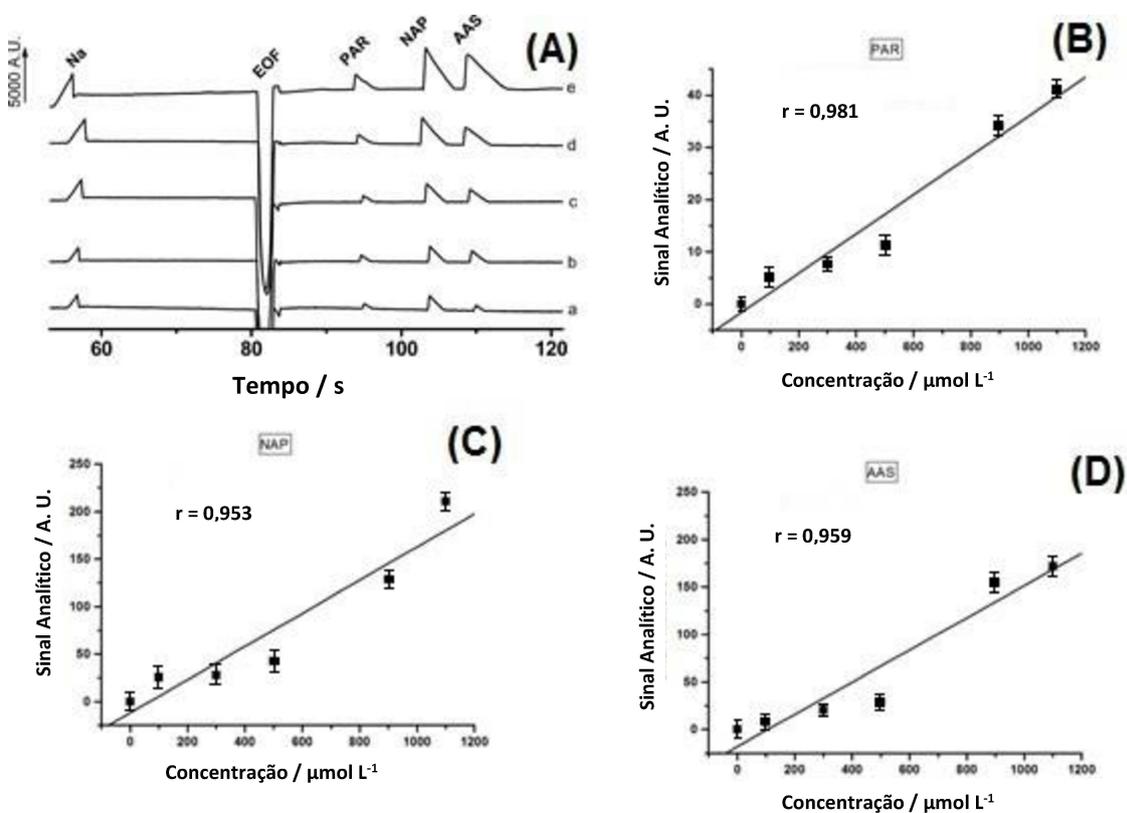
Fonte: Autor (2017).

Como pode ser visualizado nas Figuras 51, 52 e 53, o comportamento dos analitos presentes na solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR+NAP+AAS no BGE composto por 20 mmol L^{-1} de β -alanina com pH corrigido até pH 10,5 com LiOH apresenta uma sensibilidade extremamente baixa para o PAR, bem como uma co-migração dos outros dois fármacos, não viabilizando a análise neste BGE. Já quando o pH do BGE foi ajustado com NH_4OH , devido, provavelmente, ao aumento da mobilidade eletroforética do BGE pela presença deste composto, ocorreu a diminuição do sinal analítico do AAS e assim melhorando resolução entre NAP e AAS. No entanto, não foi notada praticamente nenhuma melhora em relação à sensibilidade para PAR. Por último, houve uma grande modificação no comportamento dos analitos quando se corrigiu o pH do BGE com uma solução de KOH. A elevada mobilidade do potássio aumentou consideravelmente a mobilidade do BGE. Esse aumento foi suficiente para que ultrapassasse a mobilidade dos analitos, causando uma inversão do sinal analítico e elevando a sensibilidade sem modificar o ruído da linha base e, assim, obtendo um melhor SNR para o PAR.

4.2.2.1.2 Estudo de linearidade e calibração analítica

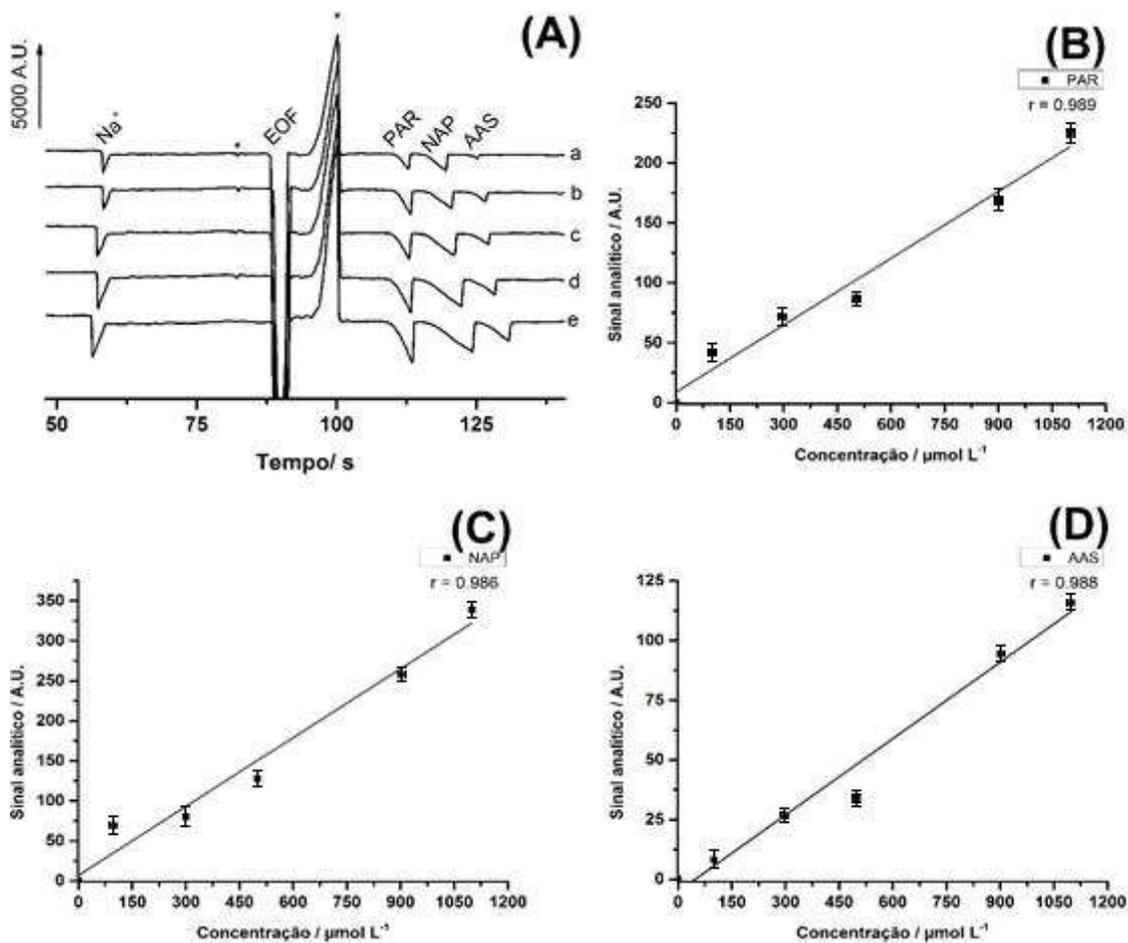
Ainda assim, como os BGE's com pH ajustado com NH_4OH e KOH apresentaram resultados viáveis para a análise, procedeu-se um estudo de linearidade para os fármacos aniônicos do grupo em questão (Figuras 54 e 55) com intuito de selecionar o melhor entre eles.

Figura 54 – (A) Eletroferogramas obtidos pelas injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de PAR, NAP e AAS (100, 300, 500, 900 e 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina com pH corrigido até 10,5 com NH_4OH e 10% etanol. Outras condições, vide Figura 50. Curvas de calibração para (B) PAR, (C) NAP e (D) AAS com dados obtidos dos eletroferogramas em (A).



Fonte: Autor (2017).

Figura 55 - (A) Eletroferogramas obtidos com pelas injeções de soluções padrão contendo concentrações crescentes de PAR, NAP e AAS (100, 300, 500, 700 e 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} β -alanina com pH corrigido até 10,5 com KOH e 10% etanol. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50. Curvas de calibração para (B) PAR, (C) NAP e (D) AAS com dados obtidos dos eletroferogramas em (A).



Fonte: Autor (2017).

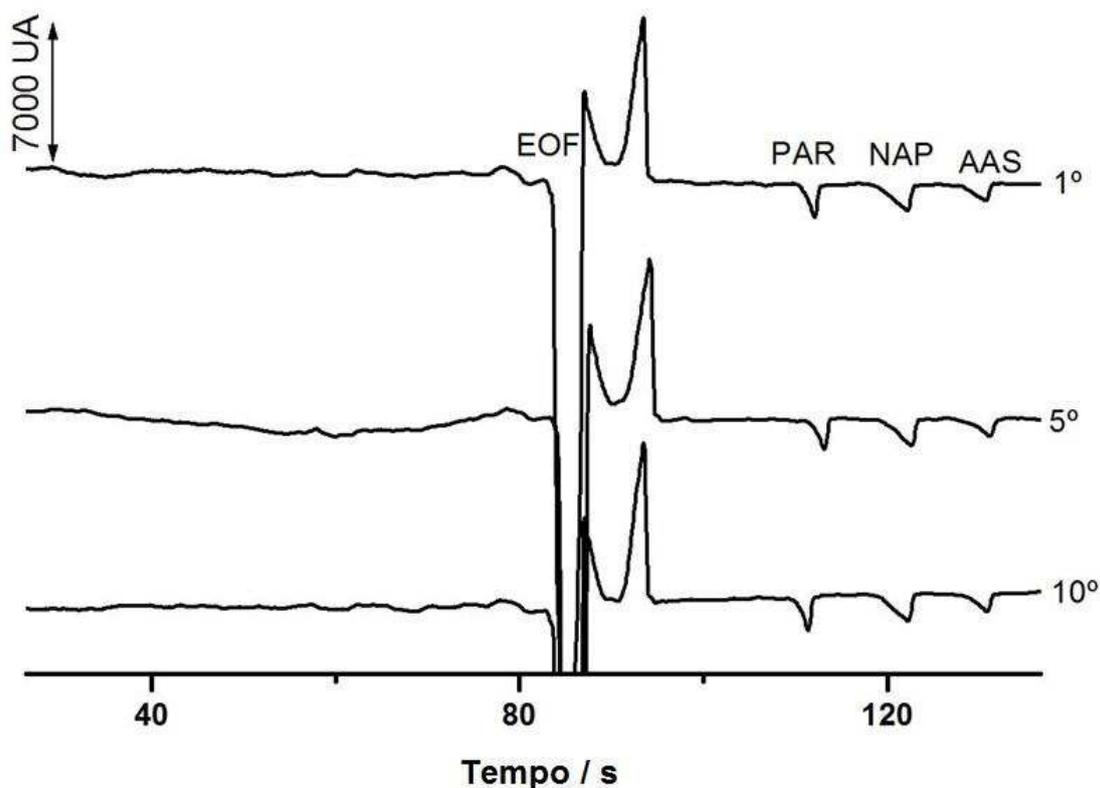
Analisando os resultados das Figuras 54 (BGE com NH_4OH) e 55 (BGE com KOH), os quais foram obtidos pela injeção das mesmas soluções padrões, fica claro a superioridade dos resultados obtidos pelo uso do BGE com KOH. Os valores encontrados para os coeficientes de correlação, bem como para os valores de sensibilidade (slope) para os analitos foram melhores com o BGE que teve seu pH ajustado com KOH, com exceção para o AAS, o qual teve a sensibilidade diminuída levemente com o uso de KOH. No entanto, a redução na sensibilidade do AAS não afeta significativamente o método, quando comparada com o ganho de sensibilidade para PAR e NAP com uso deste BGE com KOH. Devido ao exposto, além de ser menos tóxico e de mais simples preparo (KOH

não é volátil), o BGE contendo 20 mmol L⁻¹ β-alanina corrigido com KOH até pH 10,5 foi selecionado para avaliar a amostra. Como foram obtidos bons resultados com essa composição de BGE, não foi adicionado NaCl.

4.2.2.1.3 Estudo de repetibilidade

O passo seguinte foi testar a estabilidade do método através de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo os três analitos. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Figura 56.

Figura 56 - Eletroferogramas apresentando 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 500 μmol L⁻¹ de PAR, NAP e AAS para estudo de repetibilidade. Outras condições, vide Figura 53.



Fonte: Autor (2017).

O método proposto apresenta baixos desvios padrões relativos para os analitos: 4,2% 2,1% e 2,3% para PAR, NAP e AAS, respectivamente.

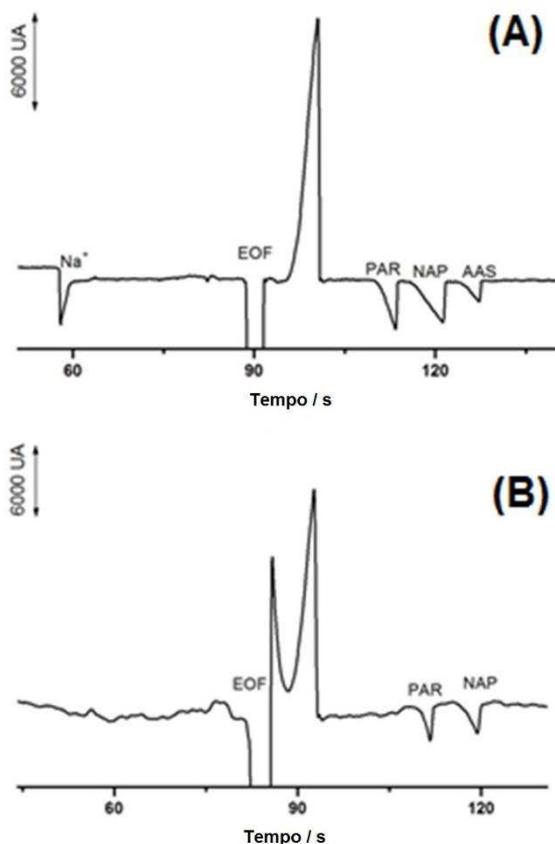
4.2.2.1.4 Aplicação do método proposto em amostras reais e comparação dos resultados via HPLC

O próximo passo foi analisar as amostras encontradas no mercado. Devido ao fato de não serem encontradas amostras contendo os três princípios ativos no mercado nacional, amostras contendo apenas PAR e NAP foram analisadas nesta etapa. Os resultados com AAS serão apresentados quando forem discutidos os estudos realizados com o grupo B, o qual também possui AAS na composição dos fármacos comercialmente disponíveis no mercado.

Duas amostras de formulações farmacêuticas distintas contendo além dos excipientes, 275 mg de NAP e 300 mg de PAR (em cápsulas) foram obtidas em drogarias locais na cidade de Uberlândia. Em cada análise, uma quantidade adequada do pó contido em três cápsulas da mesma cartela foi misturada e adequadamente dissolvida em uma solução contendo 10 % de etanol (v/v). Eletroferogramas característicos de soluções padrão e amostra contendo PAR e NAP são apresentados na Figura 57.

Como pode ser visualizado na Figura 57, o perfil da solução amostra é semelhante ao da solução padrão contendo os analitos alvo, quando observados os tempos de migração. Deve se salientar que o ruído, bem como a instabilidade na linha de base, no caso da amostra, se deve provavelmente à presença dos excipientes, no entanto, não afetando os resultados. Após o tratamento dos dados obtidos a partir das injeções das amostras em triplicatas, foram obtidos os resultados que constam na Tabela 16. Em um trabalho publicado por outros alunos do mesmo grupo, no qual é proposto outro método para determinação de PAR e NAP, foram obtidos resultados para estes dois analitos por HPLC [139]. Tais resultados, por se tratarem da mesma amostra, foram utilizados para comparação com o método CE-C⁴D proposto. Esta comparação é apresentada na Tabela 16, na qual também constam os resultados do ensaio de recuperação.

Figura 57 - (A) Eletroferograma apresentando injeção de solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, NAP e AAS. (B) Eletroferograma apresentando injeção de solução amostra contendo PAR e NAP, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 53.



Fonte: Autor (2017).

Tabela 16 – Comparação dos resultados analíticos obtidos pelo método proposto e HPLC [139] para determinação simultânea de PAR e NAP em formulações farmacêuticas (n=3), e as respectivas recuperações (n = 3) por CE-C⁴D.

Amostra	Analito	Valores do rótulo (mg / cápsula)	CE-C ⁴ D (mg / cápsula)	HPLC[139] (mg / cápsula)	Ensaio de recuperação (%)
1	PAR	300	303 ± 7	300 ± 10	93 ± 3
	NAP	275	268 ± 3	269 ± 4	96 ± 2
2	PAR	300	299 ± 8	282 ± 14	96 ± 5
	NAP	275	263 ± 6	249 ± 17	92 ± 2

Fonte: Autor (2017).

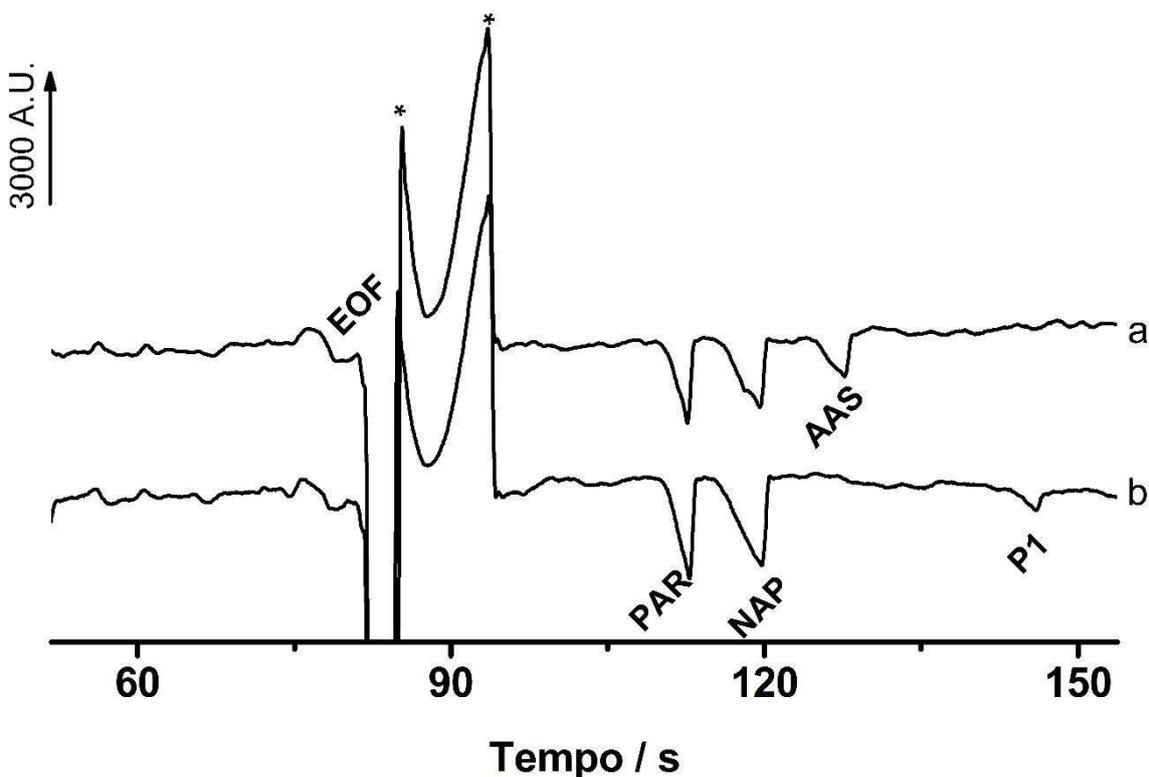
Como pode ser visualizado na Tabela 16, o ensaio de recuperação apresentou bons resultados com recuperações entre 93 e 96% para PAR e 92 e 96% para NAP (n=3).

Já os valores obtidos a partir da comparação das médias dos resultados obtidos por CE-C⁴D e por HPLC, pelo do teste t Student, calculado em nível de confiança de 95%, demonstraram valores inferiores ao valor crítico teórico de 4,303 para n=2, comprovando a similaridade entre os métodos (HPLC e CE-C⁴D). Por sua vez, os valores estatísticos provenientes do teste F não revelaram uma diferença significativa entre os desvios padrões (SD) de ambos métodos também com um nível de confiança de 95%, nos dois casos o $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}=19,0$.

4.2.2.1.5 Estudo da degradação induzida via exposição solar

Ainda, nos termos de degradação já discutidos na seção anterior, ao submeter PAR, NAP e ASS à exposição solar por 3 horas, obtemos os resultados apresentados na Figura 58.

Figura 58 - Eletroferogramas obtidos pela injeção de duas soluções padrão contendo concentrações idênticas entre si dos fármacos, sendo uma delas mantida na sombra (a) e outra exposta por 3 horas à radiação solar (b). P1 corresponde ao pico desconhecido. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 53.



Fonte: Autor (2017).

Notadamente houve degradação do sinal analítico correspondente à AAS, provavelmente por fotólise, devido à redução do sinal analítico desta espécie, bem como do surgimento de um novo sinal no tempo de 148 s, correspondente ao produto de degradação originado da exposição à luz solar. Tal sinal analítico, embora não confirmado experimentalmente, possui comportamento semelhante ao esperado das moléculas de ácido salicílico, conhecido produto de degradação do AAS. No entanto, para se confirmar tal afirmação, mais uma vez seria necessário a utilização de métodos analíticos mais refinados como aqueles com detecção por MS.

4.2.2.2 Método para determinação dos ânions dos grupos B, C e D:

Analogamente ao grupo A, foram realizados vários estudos para desenvolvimento de método para determinação dos ânions do grupo B (PAR+DIP+AAS, na presença e na ausência de CAF), do grupo C (PAR+PIR+ASC) e do grupo D (PAR+DCF, na presença e na ausência de CAF). A estratégia de se adicionar NaCl ao BGE proposto na primeira parte desta tese (20 mmol L^{-1} β -alanina + NaOH + 4 mmol L^{-1} NaCl; pH = 9,6) se apresentou apropriada para determinação de PAR. Deste modo, o primeiro estudo realizado para essa nova classe de analitos aniônicos foi em relação a seletividade neste BGE salino. Os resultados obtidos neste estudo foram anteriormente apresentados nos eletroferogramas presentes na Figura 50 (seção 4.2.2 desta tese).

Devido aos valores de pKa e também às baixas mobilidades dos ânions orgânicos em estudo, o BGE salino (adição de NaCl) também mostrou-se apropriado para essa classe de analitos. No entanto, como já mencionado, há o inconveniente em comum a algumas espécies aniônicas que, devido ao seu comportamento similar, apresentaram tempos de migração muito próximos, impossibilitando uma determinação simultânea de todos os ânions orgânicos em uma única corrida eletroforética.

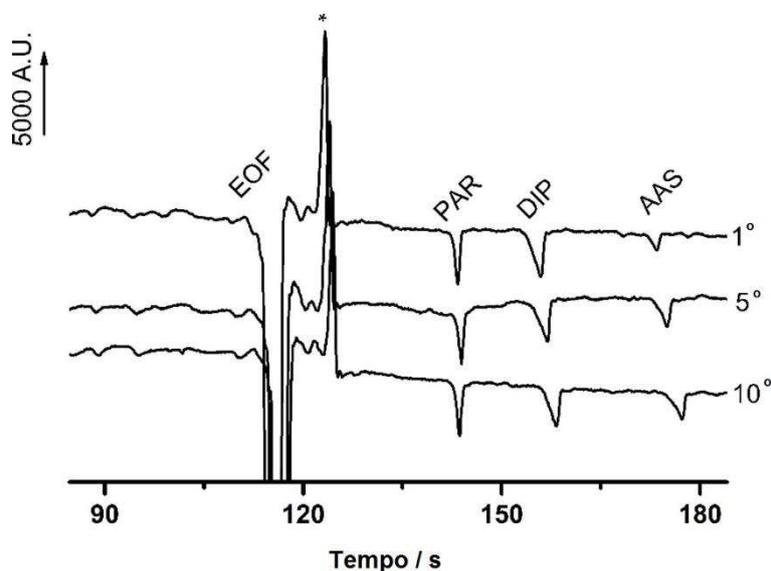
No entanto, conforme mencionado, existem formulações farmacêuticas contendo os componentes dos grupos B e D associados à CAF. Deste modo, como a CAF faz parte da composição dos medicamentos, foi feita uma separação dos métodos para os grupos B e C em duas partes, oferecendo, ao critério do analista, uma opção de escolha

para realizar a análise de uma amostra, quantificando ou não a CAF em seu protocolo. Caso a opção seja não determinar a CAF, valerá o método desenvolvido a partir do BGE sem uso do complexante DMX. Do contrário, caso julgue importante a presença desta droga lícitas de uso comum e cotidiano, deverá se valer do método desenvolvido com a presença de 10 mmol L^{-1} de DMX na composição do BGE (discutido posteriormente).

4.2.2.2.1 Estudo de repetibilidade

Um estudo de repetibilidade para checar a estabilidade do método para os novos analitos foi realizado usando o BGE composto por 20 mmol L^{-1} β -alanina + NaOH + 4 mmol L^{-1} NaCl (pH 9,6). Esse estudo se baseou em 10 injeções sucessivas de solução padrão contendo os analitos dos grupos B, C e D. Os resultados são apresentados nas Figuras 59, 60 e 61, respectivamente. Outras informações do método proposto são apresentadas na Tabela 17, mais adiante, após serem discutidos todos os experimentos.

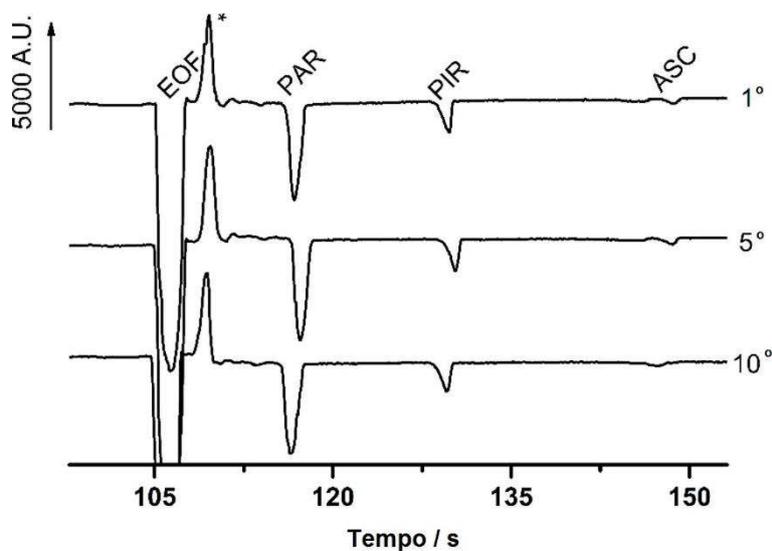
Figura 59 – Estudo de repetibilidade para analitos do Grupo B: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, DIP e AAS. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



Fonte: Autor (2017).

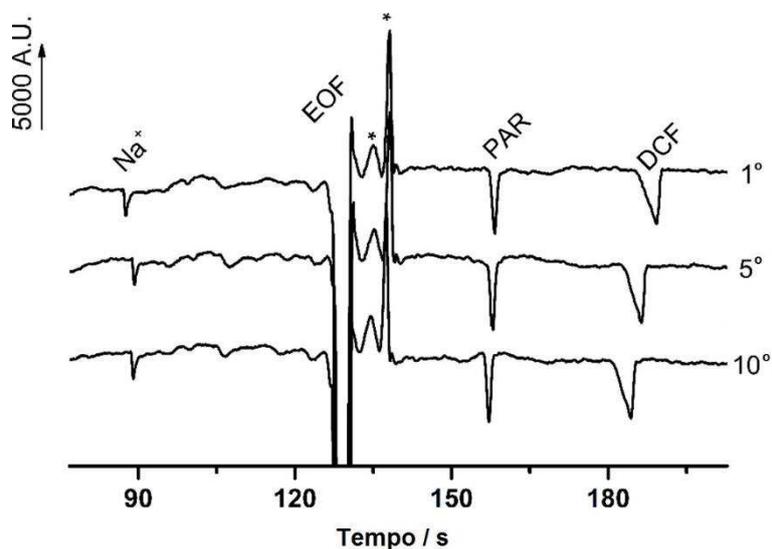
Figura 60 – Estudo de repetibilidade para analitos do Grupo C: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão

contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR, PIR e ASC. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



Fonte: Autor (2017).

Figura 61 – Estudo de repetibilidade para analitos do Grupo D: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR e DCF. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



Fonte: Autor (2017).

Como pode ser visualizado nos eletroferogramas apresentados nas Figuras 59, 60 e 61, apesar de ser possível notar ruído na linha de base, uma boa estabilidade foi obtida tanto nos tempos de migração ($\text{DPR} < 1,3\%$) quanto na área ($\text{DPR} < 0,6\%$) do sinal

analítico. Vale considerar que em todos os casos há presença de picos de sistema imediatamente após o EOF. No entanto, tais picos não comprometem a determinação dos ânions, principalmente do PAR, o qual possui tempo de migração mais próximo ao EOF. Além disso, como pode ser visualizado nos eletroferogramas do Grupo D (Figura 61), o método também é capaz de realizar a detecção/quantificação de possíveis cátions metálicos presentes em amostras farmacêuticas. Neste caso, a presença de Na^+ , o qual é o respectivo contra-íon do DCF.

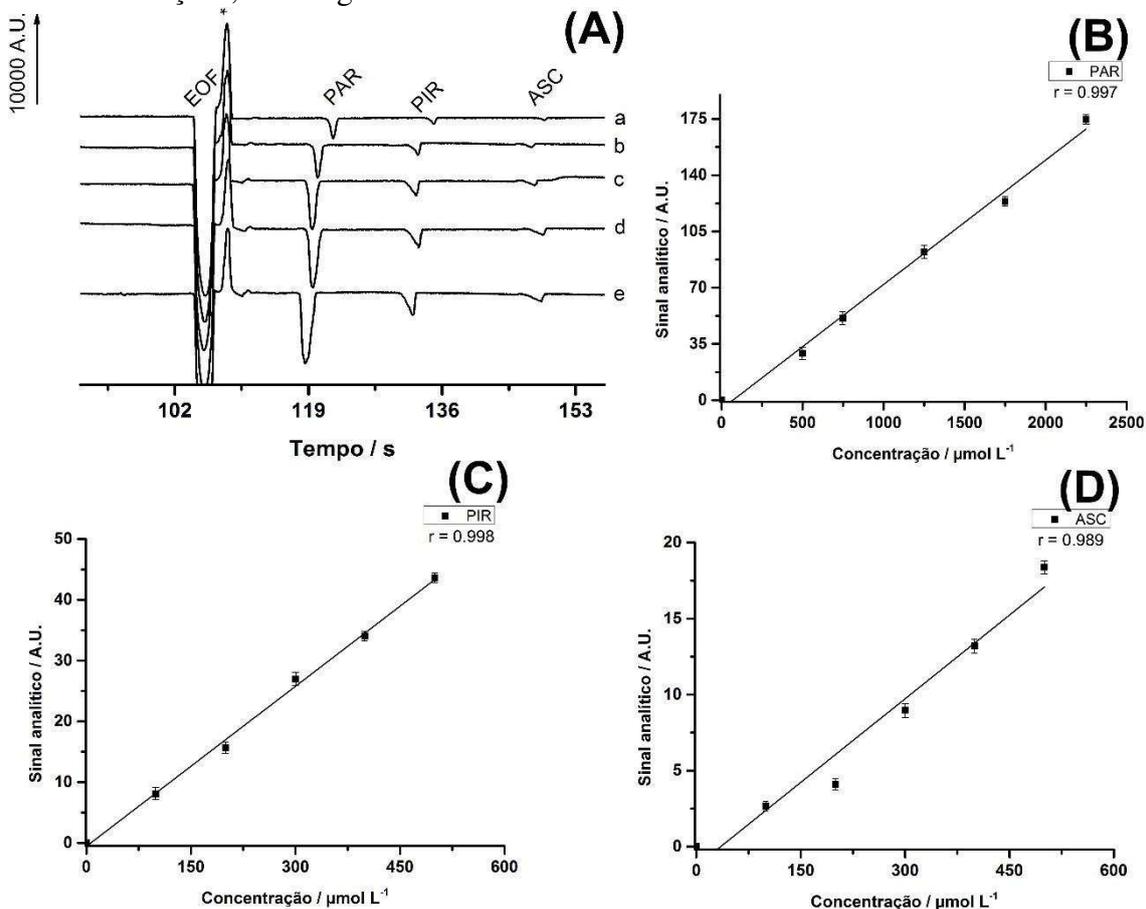
Todos os resultados obtidos com os parâmetros usados na Figuras 59, 60 e 61 estão de acordo com os valores teóricos de pK_a encontrados na literatura e apresentados anteriormente na Tabela 1 e 2 (introdução).

4.2.2.2 Estudo de linearidade e calibração analítica

O estudo da faixa linear de trabalho para os analitos em tela foi investigada a seguir, com intuito de se obter um coeficiente de correlação e de modo a ser aplicável às amostras reais de fármacos. Os resultados do estudo de linearidade são apresentados na Figura 62.

A relação observada para o PAR é linear desde $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ até $2200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0.997$), como pode ser visualizado na Figura 62. A faixa linear mostra a capacidade do método em manter suas características mesmo em elevadas concentrações do analito em questão. Tal fato é desejado e bem-vindo em se tratando das amostras com diferença de até 50 vezes em concentração entre os fármacos. Quanto aos outros analitos, a resposta linear também é satisfatória, sendo os resultados apresentados, junto à outras informações do método proposto, na Tabela 17.

Figura 62 – Linearidade do grupo C: (A) Eletroferogramas apresentando injeções de soluções padrão contendo PAR (500, 750, 1250, 1750 e 2250 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PIR e ASC (100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada); Curvas de calibração para (B) PAR, (C) PIR e (D) ASC obtidos com a partir dos dados dos eletroferogramas em (A). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.

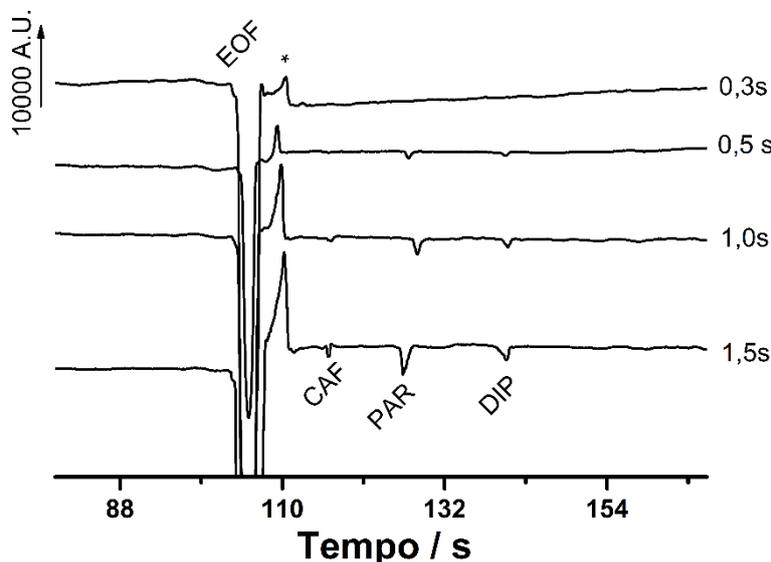


Fonte: Autor (2017).

4.2.2.2.3 Avaliação do tempo de injeção do BGE para presença de CAF

Como já mencionado, existem formulações que também contém CAF na sua composição, deste modo, é de interesse um método analítico capaz de determinar a CAF, além dos outros ânions orgânicos. Devido à necessidade de se utilizar DMX na composição do BGE (formação de complexo aniônico), novos estudos foram realizados, a partir do tempo de injeção, principalmente devido à proximidade do tempo de migração da CAF em relação ao EOF. Os seguintes tempos de injeção foram estudados: 0,3; 0,5; 1,0; e 1,5 segundos; com pressurização constante do sistema em 25 kPa e injeção no BGE composto por 10 mmol L^{-1} DMX + 20 mmol L^{-1} β -alanina + NaOH + 4 mmol L^{-1} NaCl; pH = 9,6; sendo apresentados na Figura 63.

Figura 63 - Estudo do tempo de injeção com eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo CAF, PAR e DIP (150, 750 e 900 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada, respectivamente) no BGE composto por 10 mmol L^{-1} DMX + 20 mmol L^{-1} β -alanina + NaOH + 4 mmol L^{-1} NaCl; pH = 9,6. Pressão constante de injeção: 25 kPa. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



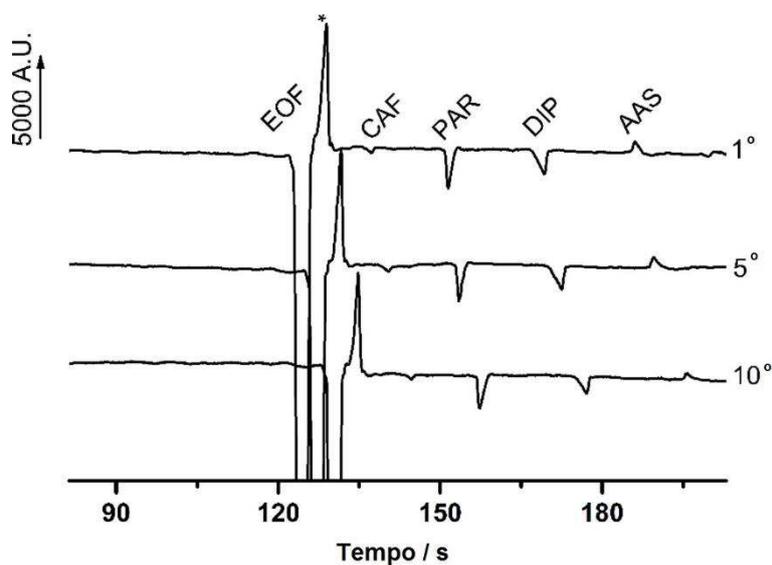
Fonte: Autor (2017).

Conforme é apresentado na Figura 63, apesar de todos os tempos a partir de 0,5s apresentarem bons resultados, foi escolhida o tempo de injeção de 1,0 s, por ser intermediário aos valores testados e por assegurar um bom comprometimento em termos de eficiência na separação, mantendo bons valores de resolução e baixa razão sinal ruído.

4.2.2.2.4 Estudo de repetibilidade do BGE para presença de CAF

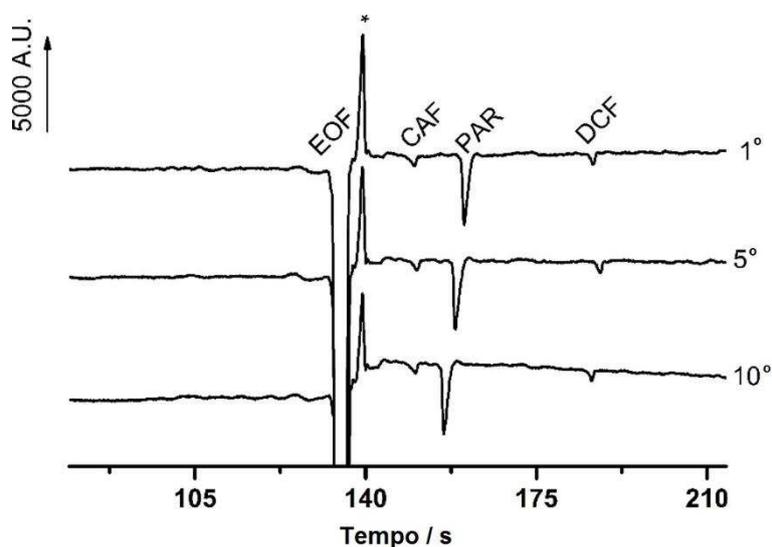
Devido ao fato de se utilizar uma composição de BGE distinta (com adição de DMX), novamente foi realizado o estudo de repetibilidade para checar a estabilidade nesta condição. Esse estudo também se baseou em 10 injeções sucessivas de solução padrão, no entanto, desta vez, os grupos de interesse foram apenas os grupos B e D, por apresentarem CAF em suas formulações comerciais. Os resultados são apresentados nas Figuras 64 e 65.

Figura 64 – Estudo de repetibilidade para os analitos do grupo B na presença de CAF: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo CAF, PAR, DIP e AAS (150, 750, 900 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada, respectivamente). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



Fonte: Autor (2017).

Figura 65 – Estudo de repetibilidade para os analitos do Grupo D na presença de CAF: Eletroferogramas apresentando 3 injeções de uma série de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo CAF, PAR e DCF (150, 750 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada, respectivamente) para estudo de repetibilidade. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



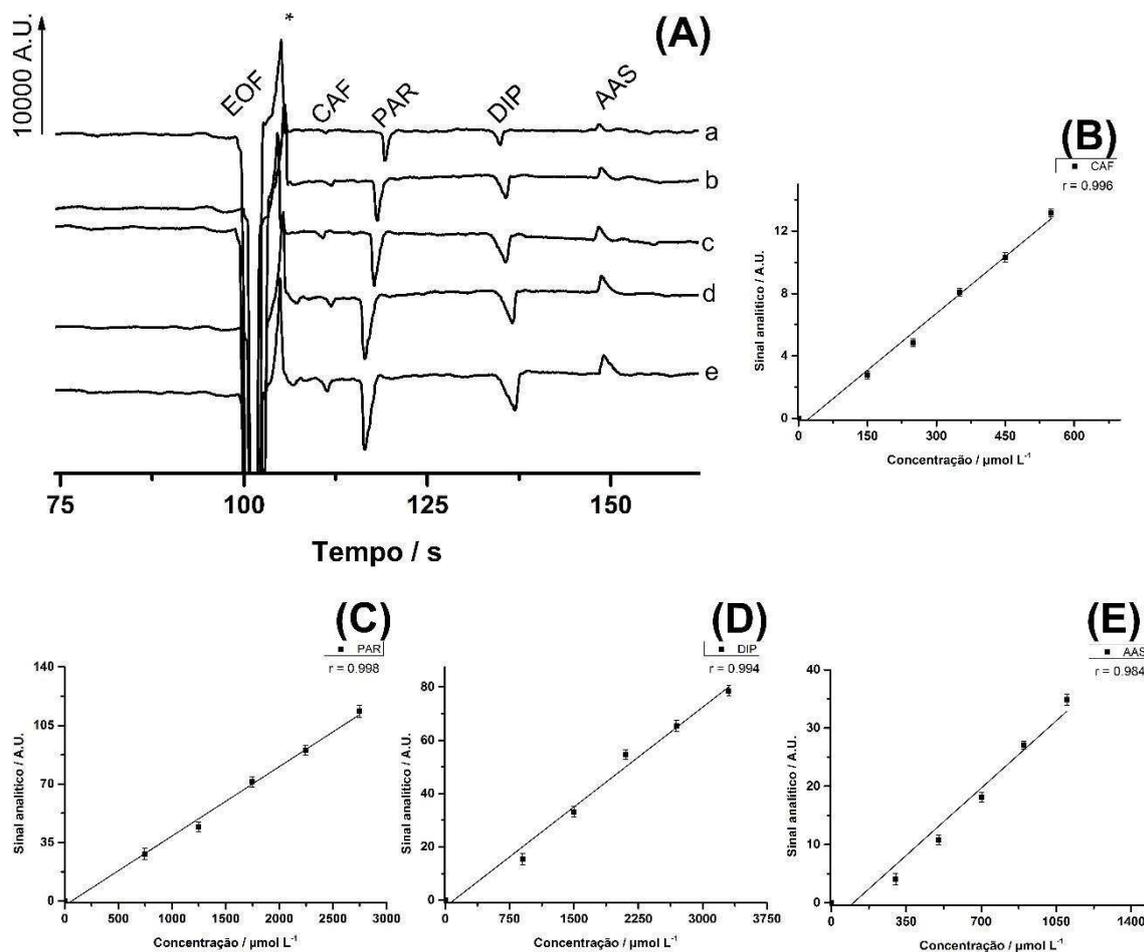
Fonte: Autor (2017).

Novamente, como pode ser visualizado nos eletroferogramas apresentados nas Figuras 64 e 65, há uma estabilidade adequada tanto de tempo de migração ($DPR \leq 2,2\%$) quanto de área ($DPR \leq 0,9\%$) dos picos de todos os analitos. Ainda foram persistentes os picos de sistema imediatamente após o EOF, no entanto, tais picos não comprometem a determinação dos ânions, principalmente da CAF, o qual possui tempo de migração mais próximo ao EOF. Um fato notadamente curioso é a presença de um pico positivo para AAS na Figura 64. Tal inversão se deve, provavelmente, devido à modificação da composição do BGE, alterando a mobilidades e a condutividade deste, de modo que os novos valores ficaram inferiores aos valores de mobilidade/condutividade da solução padrão de AAS.

4.2.2.2.5 Estudo de linearidade e calibração analítica do BGE para presença de CAF

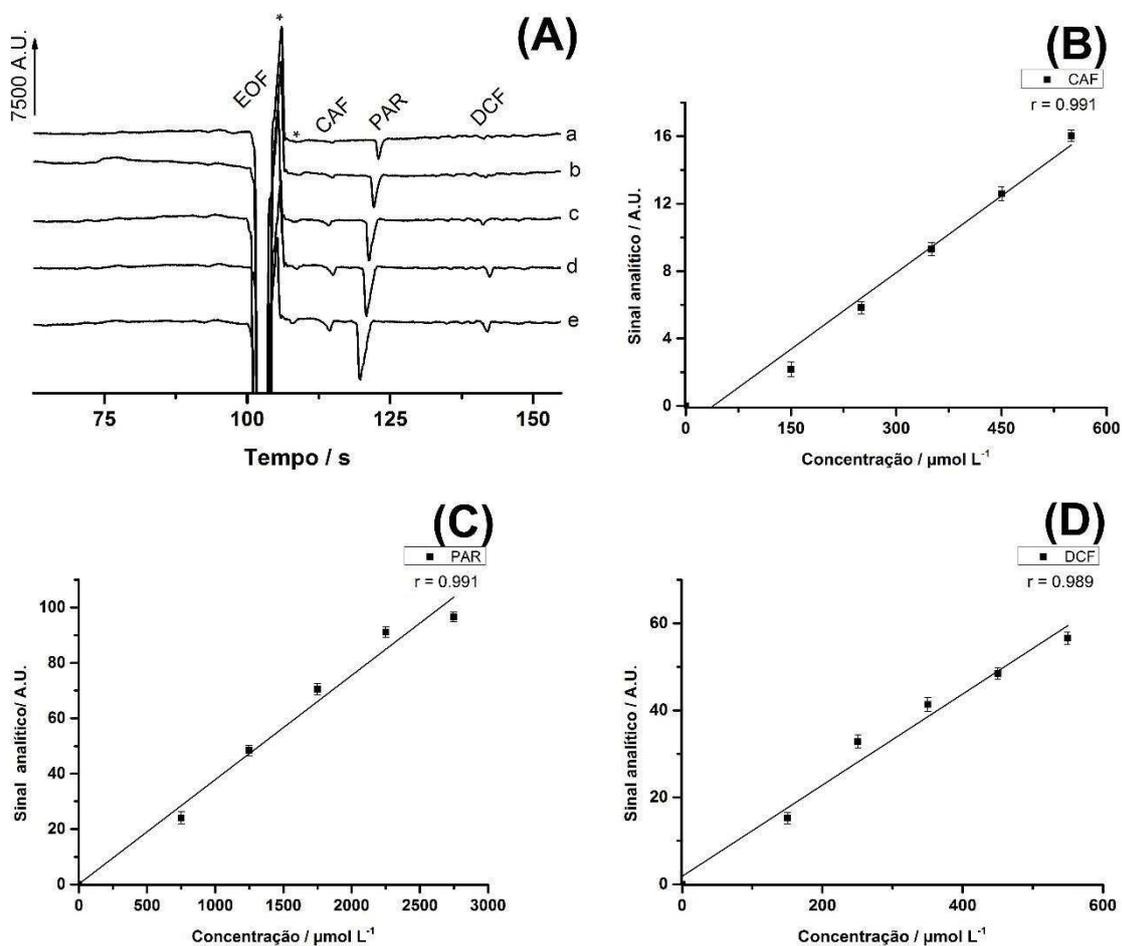
Como um novo BGE está sendo proposto para a determinação dos ânions na presença de CAF, novas curvas analíticas foram construídas com intuito de se estudar a faixa linear de trabalho. Os resultados deste estudo são apresentados para os grupos de interesse B e D (presença de CAF) nas Figuras 66 e 67. Ainda com intuito de se ter um meio o mais similar possível em relação às influências que as quantidades de fármacos encontrados nas amostras farmacêuticas, como por exemplo força iônica. Todos estudos deste trabalho foram realizados com as soluções padrões contendo concentrações similares de princípios ativos presentes àquelas encontradas nas formulações farmacêuticas comerciais.

Figura 66 – Estudo da faixa linear de resposta para os analitos do grupo B na presença de CAF: (A) Eletroferogramas obtidos com injeções de soluções padrão contendo CAF (150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (750, 1250, 1750, 2250 e 2750 $\mu\text{mol L}^{-1}$), DIP (900, 1500, 2100, 2700 e 3300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e AAS (300, 500, 700, 900 e 1100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65. Curvas analíticas para (B) CAF, (C) PAR, (D) DIP e (E) AAS após tratamento de dados dos eletroferogramas.



Fonte: Autor (2017).

Figura 67 – Estudo da faixa linear de resposta para os analitos do grupo D na presença de CAF: (A) Eletroferogramas obtidos com injeções de soluções padrão contendo CAF (150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PAR (750, 1250, 1750, 2250 e 2750 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e DCF (150, 250, 350, 450 e 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$). *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65. Curvas analíticas para (B) CAF, (C) PAR e (D) DCF após tratamento de dados dos eletroferogramas.



Fonte: Autor (2017).

Observando as Figuras 66 e 67, mais uma vez fica comprovado que existe uma relação linear, por CE- C^4D , para os compostos nas condições estudadas, sendo eficaz para a determinação destes compostos pelo método proposto devido aos valores encontrados para os coeficientes de correlação. Um resumo das características analíticas do método proposto para os analitos em foco são apresentadas na Tabela 17 mais adiante.

De modo análogo, mas não tão discrepante quanto as amostras da primeira parte deste trabalho, o PAR também se encontra em concentração superior (exceto para DIP) à dos outros ânions orgânicos presentes nos fármacos. A razão de concentração comumente encontrada entre os princípios ativos PAR:DIP, PAR:AAS, PAR:PIR,

PAR:ASC e PAR:DCF é a seguinte: 1:1,5; 2:1, 5:1, 7:1 e 7,5:1, respectivamente. Essas variações entre as concentrações dos analitos são facilmente contornadas com uso da detecção por C^4D . Esse tipo de detector possui uma ampla faixa linear de concentração para se trabalhar, não sendo problema para valores mais elevados de concentração (de até 50 vezes).

Mais uma vez, a abordagem para se obter os valores de LOD, conforme discutido na seção 4.1, foi adotada com intuito de determinar os limites de detecção. Também analogamente à primeira seção, a precisão intra-dias (DPR<5,1%; n=10) e inter-dias (DPR<7,4%; n=3) foi realizada. Os resultados obtidos permitem concluir que o método CE- C^4D aqui proposto possui como característica uma boa estabilidade.

Ainda, a exatidão do método foi avaliada mediante ensaios de recuperação (análise de amostras antes e após adição de concentrações conhecidas de cada analito). Os resultados obtidos geraram recuperações entre 91 e 101% para todos os analitos. Os resultados são apresentados na Tabela 17.

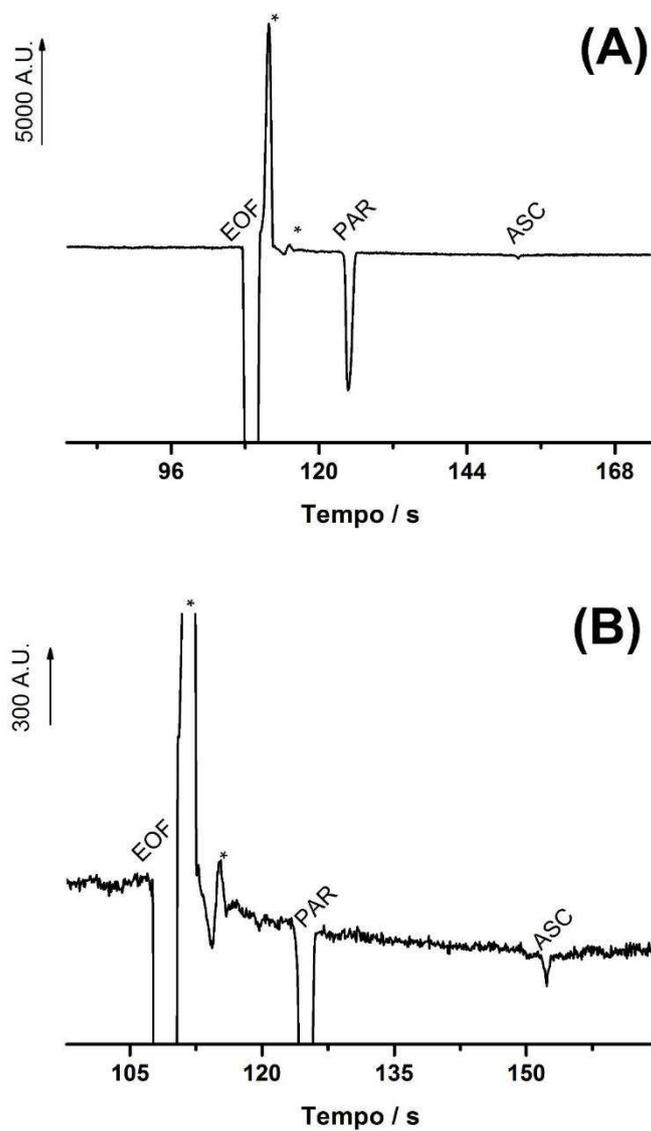
Para finalizar esta seção da tese, amostras com e sem a presença de CAF em sua composição foram adequadamente preparadas e injetadas no sistema, respeitando a composição do BGE em cada caso. Eletroferogramas mostrando o comportamento das amostras em seus BGE's apropriados (com e sem DMX) são apresentados nas Figuras 68, 69, 70, 71 e 72 (PAR+ASC; PAR+PIR; CAF+PAR+AAS; CAF+PAR+DIP; CAF+PAR+DCF, respectivamente). Os resultados do tratamento de dados a partir dos eletroferogramas obtidos da injeção de soluções contendo amostras e as curvas de calibração são apresentado na Tabela 18.

Tabela 17 - Características analíticas do método CE-C⁴D proposto para os analitos aniônicos.

	CAF	PAR	DIP	AAS	PIR	ASC	DCF
LOD ^a	1,3	1,6	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
r	0,996	0,998	0,994	0,984	0,998	0,989	0,989
Slope (<i>b</i>) ^b	2428 ± 112	7741 ± 306	2496 ± 138	3302 ± 306	8778 ± 231	3671 ± 337	10477 ± 768
Faixa linear ^a	150-550	750-2750	900-3300	300-1100	100-500	100-500	150-550
Intra dia (%; n= 10)	2,1	4,1	2,35	5,1	3,9	4,2	3,1
Inter dia (%; n = 3)	3,5	4,6	4,3	5,5	3,9	7,4	4,3
Resoluções	3,71 ± 0,04	2,23 ± 0,04	1,88 ± 0,06	2,99 ± 0,05	1,90 ± 0,04	3,12 ± 0,02	2,15 ± 0,06
Tempos de migração (s)	114,4 ± 0,5	119,7 ± 0,6	136,9 ± 0,7	148,9 ± 0,7	132,4 ± 0,8	148,5 ± 0,7	141,9 ± 0,5
Área dos picos (A.U.)	1443 ± 10	12989 ± 95	10029 ± 82	3975 ± 17	5701 ± 27	2199 ± 14	1282 ± 10
Injeções h ⁻¹	25	25	24	24	24	24	25

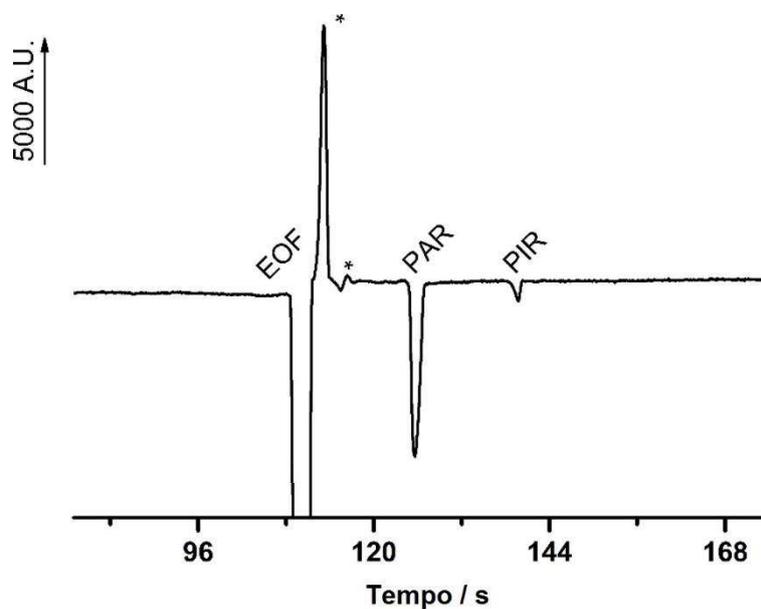
^aμmol L⁻¹, ^bRegressão linear: Sinal analítico = $a + b * [\text{analito}]$; Tempos de migração e área dos picos: n=10. Fonte: Autor (2017).

Figura 68 - (A) Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de PAR e ASC, apropriadamente diluída. (B) Zoom para melhor visualização do sinal do ASC. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



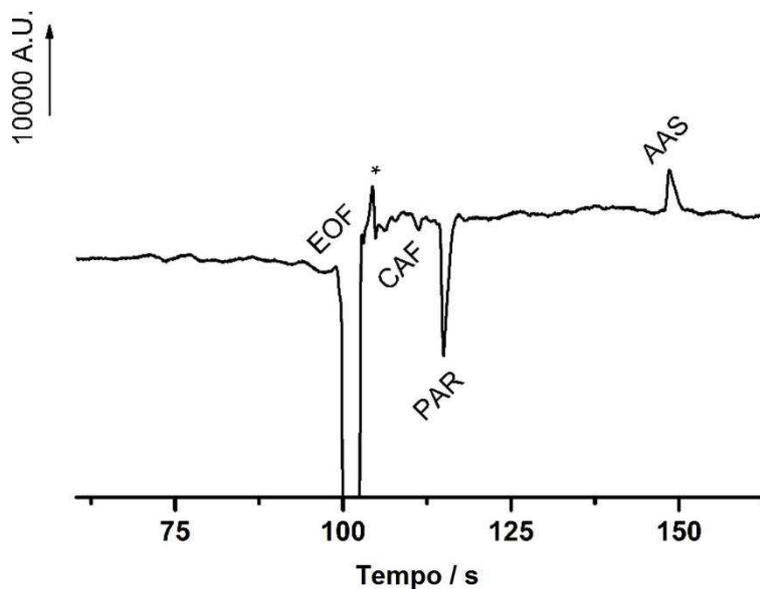
Fonte: Autor (2017).

Figura 69 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de PAR e PIR, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 50.



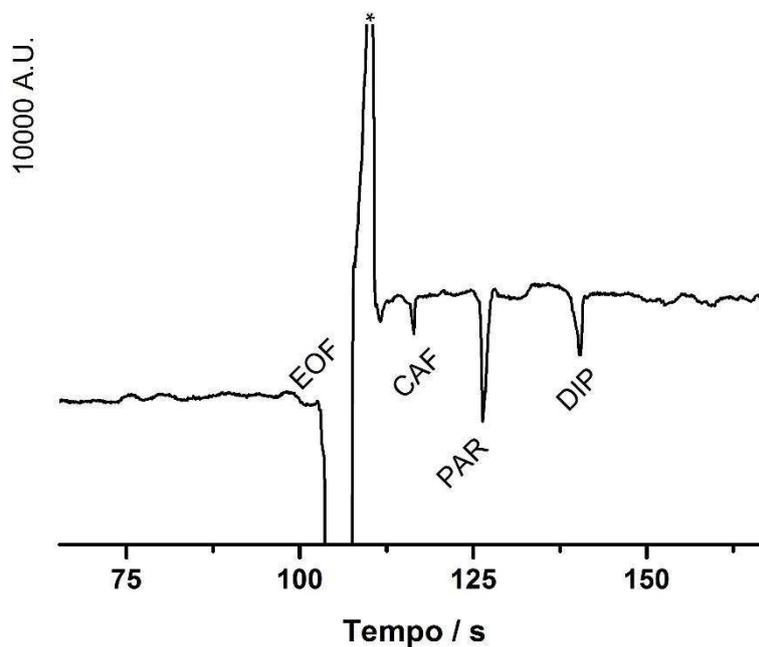
Fonte: Autor (2017).

Figura 70 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de CAF, PAR e AAS, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65.



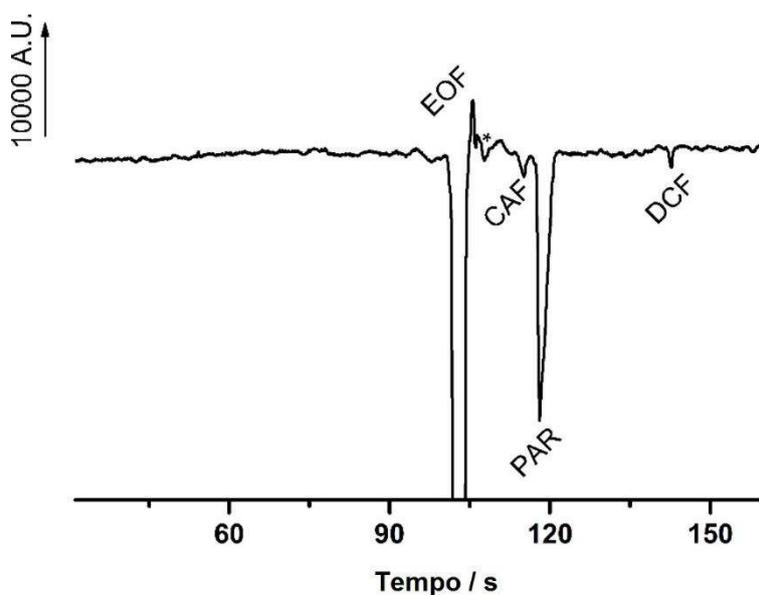
Fonte: Autor (2017).

Figura 71 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de CAF, PAR e DIP, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65.



Fonte: Autor (2017).

Figura 72 - Eletroferograma apresentando injeção de solução contendo amostra farmacêutica de CAF, PAR e DCF, apropriadamente diluída. *pico do sistema. Outras condições, vide Figura 65.



Fonte: Autor (2017).

Tabela 18 - Resultados (média \pm desvio padrão; n = 3) obtidos da determinação dos princípios ativos aniônicos presente em cinco amostras farmacêuticas usando o método CE-C⁴D proposto.

Amostras	Analitos	Valores do Rótulo mg/comprimido	CE-C ⁴ D mg/comprimido	Ensaio de Recuperação (%)
A	CAF	30	29 \pm 1	97 \pm 2
	PAR	300	300 \pm 11	101 \pm 2
	DCF	50	47 \pm 2	98 \pm 5
B	CAF	100	100 \pm 4	96 \pm 2
	PAR	500	489 \pm 13	99 \pm 3
	DIP	600	596 \pm 8	91 \pm 4
C	CAF	65	63 \pm 6	99 \pm 2
	PAR	250	244 \pm 11	102 \pm 4
	AAS	250	254 \pm 6	96 \pm 1
D	PIR	100	99 \pm 1	94 \pm 3
	PAR	500	501 \pm 16	97 \pm 5
E	ASC	40	36 \pm 6	96 \pm 5
	PAR	500	488 \pm 9	98 \pm 4

Fonte: Autor (2017).

Conforme pode ser visualizado na Tabela 17, os resultados obtidos foram similares aos informados nos rótulos dos medicamentos, com diferenças menores do que 8%. Ainda, considerando a grande diferença entre a concentração de PAR e dos outros princípios ativos, os resultados obtidos nos ensaios de recuperação podem ser considerados adequados para amostras farmacêuticas (91 % – 102 %).

4.2.3 Conclusões parciais

Os resultados obtidos e expostos neste trabalho demonstram claramente que:

- ✓ O método proposto permite a determinação rápida e simultânea de PAR na presença de CAF e IBU; CAF e AAS; CAF e DCF; CAF e DIP; PIR e/ou ASC, em formulações farmacêuticas pois fornece, além de boas resoluções, limites de detecção, robustez (em relação à variação de temperatura), seletividade e linearidade para as amostras disponíveis e avaliadas, precisão (intra e inter dia) e exatidão (ensaio de recuperação) adequados para esta finalidade. Concordantes com esta afirmação estão os resultados obtidos pelos ensaios de recuperação, e nos casos apresentados, quando comparado com os resultados obtidos com o método de referência baseado em HPLC.
- ✓ A adição de NaCl à composição do BGE demonstrou-se mais uma vez ser uma estratégia muito interessante para elevar a sensibilidade dos analitos que possuem baixa mobilidade/condutividade quando comparados à mobilidade/condutividade do BGE.
- ✓ A única modificação no BGE para determinações de medicamentos contendo CAF é feita no procedimento de preparo ao se adicionar 10 mmol L⁻¹ de DMX à composição do BGE. As etapas de preparo de amostra são simples (diluição e filtragem), sem etapas prévias de extração ou derivatização, e sem se fazer necessário o uso de um PI (normalmente requisitado em análises por CE).
- ✓ Quando comparado aos tempos de análise das técnicas preconizadas, como HPLC, o método proposto apresenta frequência analítica superior (~24 injeções h⁻¹). Assim, o método é indicado para análises rotineiras de controle de qualidade, com um consumo mínimo de solventes e reagentes, podendo ser considerado um método analítico verde (ECOfriendly) por reduzir em grande escala o custo e a geração de resíduos.

5 Conclusões gerais e perspectivas futuras

Com o desenvolvimento dos métodos propostos neste trabalho pode-se afirmar que os objetivos propostos inicialmente foram alcançados em relação à determinação rápida e simples, utilizando a técnica de CE-C⁴D, de COD, ORP, PRO, SCO, TRA, IBU, CAF, AAS, DIP, PIR, DCF, ASC e NAP, na presença de PAR, comercializados em distintas formulações farmacêuticas, em proporções de elevada discrepância de concentração de até 50:1.

Em relação à determinação rápida de COD, ORP, PRO, SCO e TRA em conjunto com PAR, a estratégia inédita proposta foi à utilização de um BGE, composto 20 mmol L⁻¹ de β-alanina + 4 mmol L⁻¹ de NaCl + 4 μmol L⁻¹ NaOH (pH 9,6). Esta estratégia proporcionou o aumento da sensibilidade para os analitos que se encontravam em valores de concentração muitas vezes menores que o PAR, além da separação e determinação dos mesmos em tempos próximos a 2 minutos. O mesmo BGE foi muito bem-sucedido ao ser aplicado a outros analitos como os ânions inorgânicos de AAS, DIP, PIR, DCF e ASC na presença de PAR.

O BGE composto por 10 mmol L⁻¹ DMX + 10 mmol L⁻¹ β-alanina e 15 mmol L⁻¹ LiOH (pH = 10,4) demonstrou ser mais apropriado para a determinação rápida (em menos de 2 minuto) e simultânea de CAF, PAR e IBU em medicamentos. Ainda, uma composição similar de BGE 10 mmol L⁻¹ DMX + 20 mmol L⁻¹ β-alanina e 15 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 10,4) se mostrou mais adequada para determinação rápida de CAF, PAR e DIP; CAF, PAR e AAS; e de CAF, PAR e DCF. Enquanto outra alteração no mesmo BGE composto por 20 mmol L⁻¹ β-alanina + 14 mmol L⁻¹ KOH (pH = 10,5), foi mais adequada para determinação rápida de simultânea de NAP e PAR.

Em relação aos métodos de CE, constantes na literatura, que realizam determinação de PAR na presença de outros princípios ativos (Tabela 3), os métodos CE-C⁴D superam os mesmos em praticamente sua totalidade nos quesitos de tempo de migração para o PAR e amplitude da faixa linear. Este último, essencial para se determinar simultaneamente PAR e outros princípios ativos com apenas um único procedimento calibração, bem como apenas uma única diluição da amostra. Ainda, apesar dos relativamente elevados valores LOD podem ser equiparados aos dos métodos reportados na literatura realizaram determinação de PAR em amostras de medicamentos, uma vez que não se faz necessário pequenos valores de LOD devido à abundante presença dos princípios ativos.

A frequência analítica obtida neste trabalho, quando comparada com método de HPLC para determinação de fármacos, foi mais rápida, resultando em menores impactos, tanto econômicos quanto ambientais. Considerando que a fase móvel de HPLC geralmente utiliza solventes orgânicos como a acetonitrila e que o método proposto CE-C⁴D usa BGE com solução aquosa, essa redução na quantidade de reagentes utilizado, (aproximadamente 10 vezes), reduz o impacto ambiental gerado pela toxicidade da acetonitrila. Assim o método proposto pode ser considerado mais ambientalmente amigável (método verde) por ir ao encontro das tendências em química analítica e ambiental.

Como perspectivas futuras, possivelmente em um pós-doutorado, há pretensão no desenvolvimento de novos métodos rápidos para determinação de drogas sintéticas (anfetaminas), como MDMA (pKa 10,14), 25I-NBOMe (pKa 8,79) metanfetamina (pKa 10,21), feniletilamina (pKa 9,83) e LSD (pKa 7,8) com intuito de ampliar a aplicabilidade de sistemas de CE-C⁴D.

6 Referências bibliográfica

- [1] Giger, W, Dealing with risk factors. Swiss Federal Institute of Aquatic Sciences and Technology 2002, 3-5.
- [2] Dal Pan, G J, Acetaminophen: Background and Overview, Center for Drug Evaluation and Research 2009.
- [3] Site da internet disponível em <https://www.statista.com/statistics/322991/sales-of-otc-pain-relief-products-in-the-us/> , acessado em 03/07/2017.
- [4] Hyllested, M, Jones, S, Pedersen, J L, Kehlet, H, Comparative effect of paracetamol, NSAIDs or their combination in postoperative pain management: a qualitative review, BJA: British Journal of Anaesthesia 2002, 88, 199-214.
- [5] Raffa, R B, Stone, D J, Tallarida, R J, Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol), Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2000, 295, 291-294.
- [6] Raffa, R B, Tallarida, R J, Management of Acute and Chronic Pain: The Use of the Tools of the Trade 2000, pp. 71-75.
- [7] Jiménez-Andrade, J M, Ortiz, M I, Pérez-Urizar, J, Aguirre-Bañuelos, P, Granados-Soto, V, Castañeda-Hernández, G, Synergistic effects between codeine and diclofenac after local, spinal and systemic administration, Pharmacology Biochemistry and Behavior 2003, 76, 463-471.
- [8] ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, v e E B, 2010b. .
- [9] Prescott, L F, Paracetamol: Past, Present, and Future, American Journal of Therapeutics 2000, 7, 143-148.
- [10] Bosch, M E, Sánchez, A J R, Rojas, F S, Ojeda, C B, Determination of paracetamol: Historical evolution, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2006, 42, 291-321.
- [11] Swain, M, chemicalize.org, Journal of Chemical Information and Modeling 2012, 52, 613-615.
- [12] Skoog, A D, West, Dm., Holler, F.J., Crouch, R.S., Fundamentos de Química. Analítica, Thonson, Learning, 2014. Tradução da 9ª ed. norte americana.
- [13] Mintzer, M Z, Griffiths, R R, Lorazepam and scopolamine: A single-dose comparison of effects on human memory and attentional processes, Experimental and Clinical Psychopharmacology 2003, 11, 56-72.

- [14] Eisele, A P P, Clausen, D N, Tarley, C R T, Dall'Antonia, L H, Sartori, E R, Simultaneous Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol, Caffeine and Orphenadrine in Pharmaceutical Formulations Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis* 2013, 25, 1734-1741.
- [15] Babaei, A, Taheri, A R, Afrasiabi, M, A Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrode as a New Sensor for the Sensitive Simultaneous Determination of Paracetamol and Tramadol in Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids, *J. Braz. Chem. Soc.* 2011, 22, 1549-1558.
- [16] Abdellatef, H E, Kinetic spectrophotometric determination of tramadol hydrochloride in pharmaceutical formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002, 29, 835-842.
- [17] Alizadeh, T, Akhoundian, M, Promethazine determination in plasma samples by using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted polymer (MIP): Coupling of extraction, preconcentration and electrochemical determination, *Electrochimica Acta* 2010, 55, 5867-5873.
- [18] Nielsen, M K K, Johansen, S S, Dalsgaard, P W, Linnet, K, Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF-MS, *Forensic Science International* 2010, 196, 85-92.
- [19] Munjal, I D, Minna, J D, Manneckjee, R, Bieck, P, Spector, S, Possible role of endogenous morphine and codeine on growth regulation of lung tissue, *Life Sciences* 1995, 57, 517-521.
- [20] Williams, D G, Hatch, D J, Howard, R F, Codeine phosphate in paediatric medicine, *BJA: British Journal of Anaesthesia* 2001, 86, 413-421.
- [21] Asomoza-Espinosa, R, Alonso-Lopez, R, Mixcoatl-Zecuatl, T, Aguirre-Banuelos, P, Torres-Lopez, J E, Granados-Soto, V, Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test, *European Journal of Pharmacology* 2001, 418, 195-200.
- [22] Mixcoatl-Zecuatl, T, Aguirre-Banuelos, P, Granados-Soto, V, Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test, *European Journal of Pharmacology* 2000, 400, 81-87.
- [23] Adams, S, Bresloff, P, Mason, C, Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (–)-isomer, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1976, 28, 256-257.
- [24] MacDonald, T, Wei, L, Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin, *The Lancet* 2003, 361, 573-574.

- [25] Karami, Z, Sadighian, S, Rostamizadeh, K, Parsa, M, Rezaee, S, Naproxen conjugated mPEG-PCL micelles for dual triggered drug delivery, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 2016, 61, 665-673.
- [26] Kearney, P M, Baigent, C, Godwin, J, Halls, H, Emberson, J R, Patrono, C, Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials, *BMJ* 2006, 332, 1302-1308.
- [27] Saritha, D, Bose, P S C, Reddy, P S, Madhuri, G, Nagaraju, R, Improved dissolution and micromeritic properties of naproxen from spherical agglomerates: preparation, in vitro and in vivo characterization, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 48, 683-690.
- [28] Santos, W T P d, Gimenes, D T, Almeida, E G N d, Eiras, S d P, Albuquerque, Y D T, Richter, E M, Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations, *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, 1249-1255.
- [29] Ergun, H, Frattarelli, D A C, Aranda, J V, Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 35, 479-487.
- [30] Oller, I, Malato, S, Sanchez-Perez, J A, Gernjak, W, Maldonado, M L, Perez-Estrada, L A, Pulgarin, C, A combined solar photocatalytic-biological field system for the mineralization of an industrial pollutant at pilot scale, *Catalysis Today* 2007, 122, 150-159.
- [31] Sawynok, J, Caffeine and pain, *Pain* 2011, 152, 726-729.
- [32] Lal, A, Pandey, K, Chandra, P, Pande, S B, Dipyrone for treatment of postoperative pain, *Anaesthesia* 1973, 28, 43-47.
- [33] Wada, H, Snell, E E, The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates, *Journal of Biological Chemistry* 1961, 236, 2089-2095.
- [34] Bester-Rogac, M, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Ion Mobility: A Conductometric Study of Salicylate, Naproxen, Diclofenac and Ibuprofen Dilute Aqueous Solutions, *Acta Chim. Slov.* 2009, 56, 70-77.
- [35] Hajkova, R, Solich, P, Pospisilova, M, Sicha, J, Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben, sodium diclofenac and its degradation product in a topical emulgel by reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 2002, 467, 91-96.

- [36] Derry, P, Derry, S, Moore, R A, McQuay, H J, Single dose oral diclofenac for acute postoperative pain in adults, *Cochrane Database Syst Rev.* 2009, 68.
- [37] Ahmad, M, Iqbal, M, Akhtar, N, Murtaza, G, Madni, M A, Rasool, F, Comparison of Bioavailability and Pharmacokinetics of Diclofenac Sodium and Diclofenac Potassium in Healthy and Escherichia coil Induced Febrile Rabbits, *Pak. J. Zool.* 2010, 42, 395-400.
- [38] Melo, C A D, Silva, P, Gomes, A D, Fernandes, D D S, Veras, G, Medeiros, A C D, Classification of Tablets containing Dipyron, Caffeine and Orphenadrine by Near Infrared Spectroscopy and Chemometric Tools, *J. Braz. Chem. Soc.* 2013, 24, 991-997.
- [39] Fitzsimons, C P, Monczor, F, Fernandez, N, Shayo, C, Davio, C, Mepyramine, a histamine H-1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein, *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279, 34431-34439.
- [40] Dalmaso, P R, Pedano, M L, Rivas, G A, Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine, *Sensors and Actuators B-Chemical* 2012, 173, 732-736.
- [41] Nogueira, T, do Lago, C L, Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3, 4-dimethoxycinnamate and separation by CZE, *Electrophoresis* 2007, 28, 3570-3574.
- [42] Kolaylı, S, Ocak, M, Küçük, M, Abbasoğlu, R, Does caffeine bind to metal ions?, *Food chemistry* 2004, 84, 383-388.
- [43] Clifford, M N, Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999, 79, 362-372.
- [44] Waldhauser, S S M, Baumann, T W, Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids, *Phytochemistry* 1996, 42, 985-996.
- [45] Gorter, K, *Justus Liebig's Ann, Chem* 1907, 358, 327.
- [46] Horman, I, Viani, R, The nature and conformation of the caffeine-chlorogenate complex of coffee, *Journal of Food Science* 1972, 37, 925-927.
- [47] Martin, R, Lilley, T H, Falshaw, C P, Haslam, E, Begley, M J, Magnolato, D, The caffeine-potassium chlorogenate molecular complex, *Phytochemistry* 1986, 26, 273-279.
- [48] Heitmeier, S, Blaschke, G, Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric

- detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999, 721, 93-108.
- [49] Palabiyik, I M, Feyyaz, O, Multivariate optimization and validation of a capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of dextromethorphan hydrobromur, phenylephrine hydrochloride, paracetamol and chlorpheniramine maleate in a pharmaceutical preparation using response surface methodology, *Analytical Sciences* 2010, 26, 853-859.
- [50] Chu, Q, Jiang, L, Tian, X, Ye, J, Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection, *Anal. Chim. Acta* 2008, 606, 246-251.
- [51] He, F Y, Liu, A L, Xia, X H, Poly(dimethylsiloxane) microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection for rapid measurement of acetaminophen and its hydrolysate, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, 379, 1062-1067.
- [52] Zhao, S, Bai, W, Yuan, H, Xiao, D, Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* 2006, 559, 195-199.
- [53] Altria, K D, Clayton, N G, Hart, M, Harden, R C, Hevizi, J, Makwana, J V, Portsmouth, M J, An inter-company cross-validation exercise on capillary electrophoresis testing of dose uniformity of paracetamol content in formulations, *Chromatographia* 1994, 39, 180-184.
- [54] Azhagvuel, S, Sekar, R, Method development and validation for the simultaneous determination of cetirizine dihydrochloride, paracetamol, and phenylpropanolamine hydrochloride in tablets by capillary zone electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 43, 873-878.
- [55] Emre, D, Özaltın, N, Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography B* 2007, 847, 126-132.
- [56] Kunkel, A, Günter, S, Wätzig, H, Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision, *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 125-133.
- [57] Ahrer, W, Scherwenk, E, Buchberger, W, Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2001, 910, 69-78.
- [58] Hasselmann, C, Diop, P A, Determination of l-ascorbic-acid in foods - A review (1976-1981), *Sci. Aliments* 1983, 3, 161-180.

- [59] Barthelemy, J P, Determination of L-ascorbic acid by high-performance liquid chromatography. A review (1986-1992), *Analisis* 1996, 24, 95-103.
- [60] Yebra-Biurrun, M C, Flow injection determination methods of ascorbic acid, *Talanta* 2000, 52, 367-383.
- [61] Novakova, L, Solich, P, Solichova, D, HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Trac-Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 942-958.
- [62] Pisoschi, A M, Pop, A, Serban, A I, Fafaneata, C, Electrochemical methods for ascorbic acid determination, *Electrochimica Acta* 2014, 121, 443-460.
- [63] Mullangi, R, Sharma, K, Srinivas, N R, Review of HPLC methods and HPLC methods with mass spectrometric detection for direct determination of aspirin with its metabolite(s) in various biological matrices, *Biomed. Chromatogr.* 2012, 26, 906-941.
- [64] Blondino, F E, Byron, P R, The quantitative-determination of aspirin and its degradation products in a model solution aerosol, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1995, 13, 111-119.
- [65] Menouer, M, Ghernati, H M, Bouabdallah, F, Guermouche, M H, Optimal conditions for the separation of salicylic-acid and acetylsalicylic-acid by HPLC - application to traces analysis of salicylic-acid in aspirin, *Analisis* 1982, 10, 172-176.
- [66] Grant, G F, Jones, R E, Cooper, J K, Hubbard, J W, Quantitation of urinary acetylsalicylic-acid metabolites using HPLC and colorimetry, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1988, 195, 17-ANYL.
- [67] Moreira, A B, Dias, I L T, Neto, G O, Zagatto, E A G, Kubota, L T, Solid-phase fluorescence spectroscopy for the determination of acetylsalicylic acid in powdered pharmaceutical samples, *Anal. Chim. Acta* 2004, 523, 49-52.
- [68] Bochenska, P, Pyka, A, determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical drugs by TLC with densitometric detection in UV, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2012, 35, 1346-1363.
- [69] Neuberger, S, Jooss, K, Ressel, C, Neuss, C, Quantification of ascorbic acid and acetylsalicylic acid in effervescent tablets by CZE-UV and identification of related degradation products by heart-cut CZE-CZE-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016, 408, 8701-8712.
- [70] Schnierle, P, Kappes, T, Hauser, P C, Capillary electrophoretic determination of different classes of organic ions by potentiometric detection with coated-wire ion-selective electrodes, *Anal. Chem.* 1998, 70, 3585-3589.

- [71] Sekar, R, Prasad, P R, Vairamani, M, Determination of acetylsalicylic acid and related substances in pharmaceutical preparations and bulk drugs by capillary electrophoresis, *Indian Journal of Chemical Technology* 2003, 10, 603-606.
- [72] Neuberger, S, Jooss, K, Flottmann, D, Scriba, G, Neuss, C, Raman spectroscopy and capillary zone electrophoresis for the analysis of degradation processes in commercial effervescent tablets containing acetylsalicylic acid and ascorbic acid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017, 134, 122-129.
- [73] Welder, F, Colyer, C L, Using capillary electrophoresis to determine the purity of acetylsalicylic acid synthesized in the undergraduate laboratory, *Journal of Chemical Education* 2001, 78, 1525-1527.
- [74] Usifoh, C O, Adelusi, S A, Adebambo, R F, Colorimetric determination of paracetamol in raw material and in pharmaceutical dosage forms, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 2002, 45, 7-9.
- [75] Ellcock, C T H, Fogg, A G, Selective colorimetric determination of paracetamol by means of an indophenol reaction, *The Analyst* 1975, 100, 16-18.
- [76] Bouhsain, Z, Garrigues, S, Morales-Rubio, A, De La Guardia, M, Flow injection spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals by means of on-line microwave-assisted hydrolysis and reaction with 8-hydroxyquinoline (8-quinolinol), *Anal. Chim. Acta* 1996, 330, 59-69.
- [77] Criado, A, Cárdenas, S, Gallego, M, Valcárcel, M, Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis, *Talanta* 2000, 53, 417-423.
- [78] Filik, H, Hayvali, M, Kilic, E, Sequential spectrophotometric determination of paracetamol and p-aminophenol with 2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) bis-8-hydroxyquinoline as a novel coupling reagent after microwave assisted hydrolysis, *Anal. Chim. Acta* 2005, 535, 177-182.
- [79] Çekiç, S D, Filik, H, Apak, R, Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol and p-aminophenol in pharmaceutical products with tiron using dissolved oxygen as oxidant, *Journal of Analytical Chemistry* 2005, 60, 1019-1023.
- [80] Verma, K K, Jain, A, Stewart, K K, Flow-injection spectrophotometric determination of acetaminophen in drug formulations, *Anal. Chim. Acta* 1992, 261, 261-267.
- [81] Georgiou, C A, Koupparis, M A, Automated flow injection spectrophotometric determination of para- and meta-substituted phenols of pharmaceutical interest based on their oxidative condensation with 1-nitroso-2-naphthol, *The Analyst* 1990, 115, 309-313.

- [82] Ayora Cañada, M J, Pascual Reguera, M I, Ruiz Medina, A, Fernández De Córdoba, M L, Molina Díaz, A, Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, 22, 59-66.
- [83] El Mouelhi, M, Buszewski, B, Application of solid-phase extraction to the isolation and determination of paracetamol and its metabolites, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1990, 8, 651-653.
- [84] Parojčić, J, Karljiković-Rajić, K, Durić, Z, Jovanović, M, Ibrić, S, Development of the second-order derivative UV spectrophotometric method for direct determination of paracetamol in urine intended for biopharmaceutical characterisation of drug products, *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2003, 24, 309-314.
- [85] Di Girolamo, A, O'Neill, W M, Wainer, I W, A validated method for the determination of paracetamol and its glucuronide and sulphate metabolites in the urine of HIV+/AIDS patients using wavelength-switching UV detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1998, 17, 1191-1197.
- [86] Gasco-Lopez, A I, Izquierdo-Hornillos, R, Jimenez, A, Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cold relief ingredients in chewing gum, *J. Chromatogr. A* 1997, 775, 179-185.
- [87] Messina, G A, De Vito, I E, Raba, J, On-line microfluidic sensor integrated with an enzyme-modified pre-cell for the monitoring of paracetamol in pharmaceutical samples, *Anal. Chim. Acta* 2006, 559, 152-158.
- [88] Fatibello-Filho, O, Lupetti, K O, Vieira, I C, Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor, *Talanta* 2001, 55, 685-692.
- [89] Tan, Y, Zhou, Z, Wang, P, Nie, L, Yao, S, A study of a bio-mimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its application for the determination of paracetamol in the human serum and urine, *Talanta* 2001, 55, 337-347.
- [90] Christie, I, Leeds, S, Baker, M, Keedy, F, Vadgama, P, Direct electrochemical determination of paracetamol in plasma, *Anal. Chim. Acta* 1993, 272, 145-150.
- [91] Di Pietra, A M, Gatti, R, Andrisano, V, Cavrini, V, Application of high-performance liquid chromatography with diode-array detection and on-line post-column photochemical derivatization to the determination of analgesics, *J. Chromatogr. A* 1996, 729, 355-361.

- [92] Steinmann, L, Thormann, W, Characterization of competitive binding, fluorescent drug immunoassays based on micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis* 1996, 17, 1348-1356.
- [93] Bohnenstengel, F, Kroemer, H K, Sperker, B, In vitro cleavage of paracetamol glucuronide by human liver and kidney β -glucuronidase: Determination of paracetamol by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999, 721, 295-299.
- [94] Zhang, L, Li, L, Liu, S S, An, W L, Xue, B, Ban, L Q, Li, X M, Xu, Y L, Sodium azide induces damage of microtubules and cell viability in cultured nerve cells, *Chinese Journal of Neuroscience* 2000, 16, 257-262.
- [95] Suarez, W T, Pessoa-Neto, O D, dos Santos, V B, Nogueira, A R D, Faria, R C, Fatibello, O, Chamarrod, J A, A Compact Miniaturized Flow System Based on Low-Temperature Co-fired Ceramic Technology Coupled to LED Mini-photometer for Determination of Dipyrone in Pharmaceutical Formulations, *J. Braz. Chem. Soc.* 2013, 24, 847-+.
- [96] Perez, J A P, Alegria, J S D, Hernando, P F, Sierra, A N, Determination of dipyrone in pharmaceutical preparations based on the chemiluminescent reaction of the quinolinic hydrazide-H₂O₂-vanadium(IV) system and flow-injection analysis, *Luminescence* 2012, 27, 45-50.
- [97] Ramadan, A A, Mandil, H, Hafez, B, Determination of Dipyrone in Pure Form and Pharmaceutical Formulations by Differential Pulse Polarographic Analysis, *Asian Journal of Chemistry* 2011, 23, 403-406.
- [98] Bindewald, E H, Bergamini, M F, Marcolino, L H, Disposable Solid-State Sensor Based on Polypyrrole Films Doped for Potentiometric Determination of Dipyrone in Human Urine and Pharmaceuticals Products, *Electroanalysis* 2013, 25, 1535-1540.
- [99] Suarez, W T, Pessoa-Neto, O D, Vicentini, F C, Janegitz, B C, Faria, R C, Fatibello, O, Flow Injection Spectrophotometric Determination of Dipyrone in Pharmaceutical Formulations Using Fe(III) as Reagent, *Analytical Letters* 2011, 44, 340-348.
- [100] Sanches, F A C, Abreu, R B, Pontes, M J C, Leite, F C, Costa, D J E, Galvao, R K H, Araujo, M C U, Near-infrared spectrometric determination of dipyrone in closed ampoules, *Talanta* 2012, 92, 84-86.
- [101] de Souza, R L, Tubino, M, Spectrophotometric determination of diclofenac in pharmaceutical preparations, *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, 16, 1068-1073.
- [102] Sena, M M, Chaudhry, Z F, Collins, C H, Poppi, R J, Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry

- and partial least squares regression, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 36, 743-749.
- [103] Agatonovickustrin, S, Zivanovic, L, Radulovic, D, Vasiljevic, M, Experimental-design applied to a spectrophotometric study of a diclofenac sodium-copper(ii) complex, *Analyst* 1991, 116, 753-756.
- [104] Fabre, H, Sun, S W, Mandrou, B, Maillols, H, Assay validation for an active ingredient in a pharmaceutical formulation - practical approach using ultraviolet spectrophotometry, *Analyst* 1993, 118, 1061-1064.
- [105] Arancibia, J A, Escandar, G M, Complexation study of diclofenac with beta-cyclodextrin and spectrofluorimetric determination, *Analyst* 1999, 124, 1833-1838.
- [106] Lansdorp, D, Janssen, T J, Guelen, P J M, Vree, T B, High-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine, *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1990, 528, 487-494.
- [107] Wiese, B, Hermansson, J, Bioanalysis of diclofenac as its fluorescent carbazole acetic-acid derivative by a postcolumn photoderivatization high-performance liquid-chromatographic method, *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1991, 567, 175-183.
- [108] Aurora-Prado, M S, Steppe, M, Tavares, M F M, Kedor-Hackmann, E R M, Santoro, M, Comparison between capillary electrophoresis and liquid chromatography for the determination of diclofenac sodium in a pharmaceutical tablet, *Journal of Aoac International* 2002, 85, 333-340.
- [109] Solangi, A, Memon, S, Mallah, A, Memon, N, Khuhawar, M Y, Bhangar, M I, Determination of ceftriaxone, ceftizoxime, paracetamol, and diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis in pharmaceutical formulations and in human blood serum, *Turkish Journal of Chemistry* 2010, 34, 921-933.
- [110] Solangi, A R, Memon, S Q, Mallah, A, Memon, N, Khuhawar, M Y, Bhangar, M I, Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013, 24, 539-544.
- [111] Jin, W R, Zhang, J, Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* 2000, 868, 101-107.

- [112] Mokhtari, A, Karimi-Maleh, H, Ensafi, A A, Beitollahi, H, Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples, *Sensors and Actuators B-Chemical* 2013, 169, 96-105.
- [113] Gimenes, D T, de Freitas, J M, Munoz, R A A, Richter, E M, Flow-Injection Amperometric Method for Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis* 2011, 23, 2521-2525.
- [114] Hassan, S S M, Abdelaziz, R M, Abdelsamad, M S, Plastic membrane-electrode for selective determination of diclofenac (voltaren) in pharmaceutical preparations, *Analyst* 1994, 119, 1993-1996.
- [115] Mazurek, S, Szostak, R, Comparison of infrared attenuated total reflection and Raman spectroscopy in the quantitative analysis of diclofenac sodium in tablets, *Vibrational Spectroscopy* 2011, 57, 157-162.
- [116] Castillo, M A, Bruzzone, L, Indirect fluorometric determination of diclofenac sodium, *Analytical Sciences* 2006, 22, 431-433.
- [117] Damiani, P C, Bearzotti, M, Cabezón, M A, Olivieri, A C, Spectrofluorometric determination of diclofenac in tablets and ointments, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999, 20, 587-590.
- [118] Tubino, M, De souza, R L, Gravimetric method for the determination of diclofenac in pharmaceutical preparations, *Journal of Aoac International* 2005, 88, 1684-1687.
- [119] Wasels, R, Belleville, F, Gas-chromatographic mass-spectrometric procedures used for the identification and determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine, *J. Chromatogr. A* 1994, 674, 225-234.
- [120] Svensson, J, Yue, Q, Säwe, J, Determination of codeine and metabolites in plasma and urine using ion-pair high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1995, 674, 49-55.
- [121] Greenway, G M, Knight, A W, Knight, P J, Electrogenerated chemiluminescent determination of codeine and related alkaloids and pharmaceuticals with tris (2, 2'-bipyridine) ruthenium (II), *Analyst* 1995, 120, 2549-2552.
- [122] Barnett, N W, Bowser, T A, Gerardi, R D, Smith, B, Determination of codeine in process streams using flow-injection analysis with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta* 1996, 318, 309-317.

- [123] Shih, Y, Zen, J-M, Yang, H-H, Determination of codeine in urine and drug formulations using a clay-modified screen-printed carbon electrode, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2002, 29, 827-833.
- [124] Ceyhan, T, Kartal, M, Altun, M L, Tulemis, F, Cevheroglu, S, LC determination of atropine sulfate and scopolamine hydrobromide in pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001, 25, 399-406.
- [125] Mostafa, G A, Potentiometric PVC membrane sensor for the determination of scopolamine in some pharmaceutical formulations, *Analytical Sciences* 2002, 18, 1335-1338.
- [126] Santos, S B, Valezi, C F, Scremin, J, Salamanca-Neto, C A R, Dall'Antonia, L H, Sartori, E R, A simple square-wave voltammetric method for the determination of scopolamine in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode, *Quimica Nova* 2014, 37, 1579-1583.
- [127] Nakamura, M, Ono, M, Nakajima, T, Ito, Y, Aketo, T, Haginaka, J, Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing scopolia extract, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 37, 231-237.
- [128] Rajabi, H R, Zarezadeh, A, Development of a new chemically modified carbon paste electrode based on nano-sized molecular imprinted polymer for selective and sensitive determination of naproxen, *Journal of Materials Science-Materials in Electronics* 2016, 27, 10911-10920.
- [129] Sarhangzadeh, K, Application of multi wall carbon nanotube-graphene hybrid for voltammetric determination of naproxen, *Journal of the Iranian Chemical Society* 2015, 12, 2133-2140.
- [130] Lenik, J, Lyszczek, R, Functionalized beta-cyclodextrin based potentiometric sensor for naproxen determination, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* 2016, 61, 149-157.
- [131] Lian, H X, Hu, Y L, Li, G K, Novel metal ion-mediated complex imprinted membrane for selective recognition and direct determination of naproxen in pharmaceuticals by solid surface fluorescence, *Talanta* 2013, 116, 460-467.
- [132] Aguilar-Lira, G Y, Romero, G A A, Rojas-Hernandez, A, Paez-Hernandez, M E, Rodriguez-Avila, J A, Romero-Romo, M A, Voltammetric Analysis of Naproxen in Graphite Electrodes and Its Determination in Pharmaceutical Samples, *Electroanalysis* 2014, 26, 1573-1581.

- [133] Tashkhourian, J, Hemmateenejad, B, Beigizadeh, H, Hosseini-Sarvari, M, Razmi, Z, ZnO nanoparticles and multiwalled carbon nanotubes modified carbon paste electrode for determination of naproxen using electrochemical techniques, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2014, 714, 103-108.
- [134] Stefano, J S, de Lima, A P, Montes, R H O, Richter, E M, Munoz, R A A, Fast Determination of Naproxen in Pharmaceutical Formulations by Batch Injection Analysis with Pulsed Amperometric Detection, *J. Braz. Chem. Soc.* 2012, 23, 1834-1838.
- [135] Pyka, A, Wiatr, E, Kwiska, K, Gurak, D, Validation thin layer chromatography for the determination of naproxen in tablets and comparison with a pharmacopeil method, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011, 34, 829-847.
- [136] Du, J X, Li, D D, Lu, J R, Chemiluminescence determination of naproxen based on europium(III)-sensitized KIO(4)-H₂O₂ reaction, *Luminescence* 2010, 25, 76-80.
- [137] Kaczmarek, M, Chemiluminescence of the Reaction System Ce(IV) - Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing Europium(III) Ions and its Application to the Determination of Naproxen in Pharmaceutical Preparations and Urine, *Journal of Fluorescence* 2011, 21, 2201-2205.
- [138] Sakaguchi, Y, Yoshida, H, Hayama, T, Yoshitake, M, Itoyama, M, Todoroki, K, Yamaguchi, M, Nohta, H, Fluorous derivatization and fluoruous-phase separation for fluorometric determination of naproxen and felbinac in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, 55, 176-180.
- [139] Stefano, J S, Montes, R H O, Richter, E M, Munoz, R A A, Flow-Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometry for Simultaneous Determination of Paracetamol and Naproxen Using a Homemade Flow Cell for Screen-Printed Electrodes, *J. Braz. Chem. Soc.* 2014, 25, 484-491.
- [140] Norouzi, P, Dousty, F, Ganjali, M R, Daneshgar, P, Dysprosium Nanowire Modified Carbon Paste Electrode for the Simultaneous Determination of Naproxen and Paracetamol: Application in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluid, *International Journal of Electrochemical Science* 2009, 4, 1373-1386.
- [141] Al-Hazmi, H, Namiesnik, J, Tobiszewski, M, Application of TOPSIS for Selection and Assessment of Analytical Procedures for Ibuprofen Determination in Wastewater, *Curr. Anal. Chem.* 2016, 12, 261-267.
- [142] Padro, J M, Osorio-Grisales, J, Araricibia, J A, Olivieri, A C, Castells, C B, Enantiomeric analysis of overlapped chromatographic profiles in the presence of

- interferences. Determination of ibuprofen in a pharmaceutical formulation containing homatropine, *J. Chromatogr. A* 2016, 1467, 255-260.
- [143] El-Fataty, H M, Mabrouk, M M, Hammad, S F, El-Malla, S F, A Validated Enantioselective HPLC Method for Determination of Ibuprofen Enantiomers in Bulk and Tablet Dosage Form, *Journal of Aoac International* 2016, 99, 604-611.
- [144] Sousa, T F A, Amorim, C G, Montenegro, M, Araujo, A N, Cyclodextrin based potentiometric sensor for determination of ibuprofen in pharmaceuticals and waters, *Sensors and Actuators B-Chemical* 2013, 176, 660-666.
- [145] Grisales, J O, Arancibia, J A, Castells, C B, Olivieri, A C, Determination of enantiomeric composition of ibuprofen in pharmaceutical formulations by partial least-squares regression of strongly overlapped chromatographic profiles, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012, 910, 78-83.
- [146] Sunaric, S, Petkovic, M, Denic, M, Mitic, S, Pavlovic, A, Determination of ibuprofen in combined dosage forms and cream by direct UV spectrophotometry after solid-phase extraction, *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2013, 70, 403-411.
- [147] Lima, A B, Faria, E O, Montes, R H O, Cunha, R R, Richter, E M, Munoz, R A A, Dos Santos, W T P, Electrochemical Oxidation of Ibuprofen and Its Voltammetric Determination at a Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis* 2013, 25, 1585-1588.
- [148] Xiong, X Y, Zhang, Q Z, Nan, Y F, Gu, X F, One-step method for plasma determination of ibuprofen by chemiluminescence-coupled ultrafiltration and application in a pharmacokinetic study, *Luminescence* 2012, 27, 371-378.
- [149] Sena, M M, Freitas, C B, Silva, L C, Perez, C N, de Paula, Y O, Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical formulations by multivariate calibration, *Quimica Nova* 2007, 30, 75-79.
- [150] Lima, A B, Torres, L, Guimaraes, C, Verly, R M, da Silva, L M, Carvalho, A D, Dos Santos, W T P, Simultaneous Determination of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Samples by Differential Pulse Voltammetry Using a Boron-Doped Diamond Electrode, *J. Braz. Chem. Soc.* 2014, 25, 478-483.
- [151] Martin, M J, Pablos, F, Gonzalez, A G, Simultaneous determination of caffeine and non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and blood plasma by reversed-phase HPLC from linear gradient elution, *Talanta* 1999, 49, 453-459.

- [152] Silva, W C, Pereira, P F, Marra, M C, Gimenes, D T, Cunha, R R, da Silva, R A B, Munoz, R A A, Richter, E M, A Simple Strategy for Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine Using Flow Injection Analysis with Multiple Pulse Amperometric Detection, *Electroanalysis* 2011, 23, 2764-2770.
- [153] Khoshayand, M R, Abdollahi, H, Shariatpanahi, M, Saadatfard, A, Mohammadi, A, Simultaneous spectrophotometric determination of paracetamol, ibuprofen and caffeine in pharmaceuticals by chemometric methods, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 2008, 70, 491-499.
- [154] Cunha, R R, Chaves, S C, Ribeiro, M, Torres, L, Munoz, R A A, Dos Santos, W T P, Richter, E M., 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* 2015, 38, 1657-1662.
- [155] Santos, J L, Aparicio, I, Alonso, E, Callejon, M, Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors, *Anal. Chim. Acta* 2005, 550, 116-122.
- [156] Altun, M L, HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyron, *Turkish Journal of Chemistry* 2002, 26, 521-528.
- [157] Ghica, M E, Ferreira, G M, Brett, C M A, Poly(thionine)-carbon nanotube modified carbon film electrodes and application to the simultaneous determination of acetaminophen and dipyron, *Journal of Solid State Electrochemistry* 2015, 19, 2869-2881.
- [158] dos Santos, W T P, Gimenes, D T, de Almeida, E G N, Eiras, S D, Albuquerque, Y D T, Richter, E M, Simple Flow Injection Amperometric System for Simultaneous Determination of Dipyron and Paracetamol in Pharmaceutical Formulations, *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, 1249-1255.
- [159] Franeta, J T, Agbaba, D, Eric, S, Pavkov, S, Aleksic, M, Vladimirov, S, HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets, *Farmaco* 2002, 57, 709-713.
- [160] Šatínský, D, Neto, I, Solich, P, Sklenářová, H, Conceicao, M, Montenegro, B, Araújo, A N, Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets, *Journal of separation science* 2004, 27, 529-536.

- [161] GamizGracia, L, deCastro, M D L, An HPLC method for the determination of vitamin B1, caffeine, acetylsalicylic acid, and the impurities of salicylic acid in a pharmaceutical preparation, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1997, 20, 2123-2133.
- [162] Akay, C, Degim, I T, Sayal, A, Aydin, A, Ozkan, Y, Gul, H, Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol, and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms, *Turkish Journal of Medical Sciences* 2008, 38, 167-173.
- [163] Abu-Qare, A W, Abou-Donia, M B, A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001, 26, 939-947.
- [164] Ustun, M, Sungur, S, Ersoy, L, Comparison of HPLC and derivative spectrophotometric method for the determination of paracetamol (acetaminophen) and acetylsalicylic-acid in tablets, *Pharmazie* 1992, 47, 558-559.
- [165] Yigit, A, Yardim, Y, Celebi, M, Levent, A, Senturk, Z, Graphene/Nafion composite film modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical formulations, *Talanta* 2016, 158, 21-29.
- [166] Yigit, A, Yardim, Y, Senturk, Z, Voltammetric Sensor Based on Boron-Doped Diamond Electrode for Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, and Aspirin in Pharmaceutical Formulations, *Ieee Sensors Journal* 2016, 16, 1674-1680.
- [167] Murtaza, G, Khan, S A, Shabbir, A, Mahmood, A, Bin Asad, M H H, Farzana, K, Malik, N S, Hussain, I, Development of a UV-spectrophotometric method for the simultaneous determination of aspirin and paracetamol in tablets, *Scientific Research and Essays* 2011, 6, 417-421.
- [168] Ramos-Martos, N, Aguirre-Gomez, F, Molinz-Diaz, A, Capitan-Vallvey, L F, Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations, *Journal of Aoac International* 2001, 84, 676-683.
- [169] Duarte, E H, Kubota, L T, Tarley, C R T, Carbon Nanotube Based Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid Exploiting Multiple Response Optimization and Measures in the Presence of Surfactant, *Electroanalysis* 2012, 24, 2291-2301.
- [170] Filik, H, Avan, A A, Aydar, S, Cetintas, G, Determination of Acetaminophen in the Presence of Ascorbic Acid Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Poly(Caffeic acid), *International Journal of Electrochemical Science* 2014, 9, 148-160.

- [171] Wang, J L, Huo, J E, Li, J, Shangguan, E B, Li, Q M, Simultaneous determination of ascorbic acid and acetaminophen at the pre-anodized inlaying ultrathin carbon paste electrode, *Analytical Methods* 2013, 5, 4119-4125.
- [172] Tyszczyk-Rotko, K, Beczkowska, I, Wojciak-Kosior, M, Sowa, I, Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and ascorbic acid using a boron-doped diamond electrode modified with Nafion and lead films, *Talanta* 2014, 129, 384-391.
- [173] Habibi, B, Jahanbakhshi, M, Pournaghi-Azar, M H, Differential pulse voltammetric simultaneous determination of acetaminophen and ascorbic acid using single-walled carbon nanotube-modified carbon-ceramic electrode, *Analytical Biochemistry* 2011, 411, 167-175.
- [174] Sarakbi, A, Aydogmus, Z, Sidali, T, Gokce, G, Kauffmann, J M, Simultaneous Determination of Acetaminophen (Paracetamol) and Ascorbic Acid in Pharmaceutical Formulations by LC Coupled to a Screen Printed Carbon Based Amperometric Detector, *Electroanalysis* 2011, 23, 29-36.
- [175] Pournaghi-Azar, M H, Saadatirad, A, Simultaneous Determination of Paracetamol, Ascorbic Acid and Codeine by Differential Pulse Voltammetry on the Aluminum Electrode Modified by Thin Layer of Palladium, *Electroanalysis* 2010, 22, 1592-1598.
- [176] Lourencao, B C, Medeiros, R A, Rocha, R C, Fatibello, O, Simultaneous Differential Pulse Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations Using a Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis* 2010, 22, 1717-1723.
- [177] Castellano, P M, Vignaduzzo, S E, Maggio, R M, Kaufman, T S, Application of a chemometric method for simultaneous determination of acetaminophen and diclofenac in content-uniformity and drug-dissolution studies, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, 382, 1711-1714.
- [178] Afshar, E, Jalali, F, Sensitive simultaneous determination of paracetamol and diclofenac based on au nanoparticles - functionalized graphene/poly (l-arginine) glassy carbon electrode, *Journal of the Chilean Chemical Society* 2016, 61, 2846-2851.
- [179] Dighe, V V, Sane, R T, Menon, S N, Tambe, H N, Pillai, S, Gokarn, V N, Simultaneous determination of diclofenac sodium and paracetamol in a pharmaceutical preparation and in bulk drug powder by high-performance thin-layer chromatography, *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* 2006, 19, 443-448.

- [180] Shinde, V M, Tendolkar, N M, Desai, B S, Simultaneous determination of paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical preparations by quantitative TLC, *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* 1994, 7, 50-53.
- [181] Okoth, O K, Yan, K, Liu, L, Zhang, J D, Simultaneous Electrochemical Determination of Paracetamol and Diclofenac Based on Poly(diallyldimethylammonium chloride) Functionalized Graphene, *Electroanalysis* 2016, 28, 76-82.
- [182] Belal, T, Awad, T, Clark, C R, Determination of Paracetamol and Tramadol Hydrochloride in Pharmaceutical Mixture Using HPLC and GC-MS, *Journal of Chromatographic Science* 2009, 47, 849-854.
- [183] Manokaran, J, Narendranath, J, Muruganantham, R, Balasubramanian, N, Nitrogen doped graphene supported Pt-Pd nanoparticle modified GC electrode for electrochemical determination of tramadol and paracetamol, *Indian Journal of Chemistry Section a-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry* 2017, 56, 63-68.
- [184] Kamble, R M, Singh, S G, Stability-Indicating RP-HPLC Method for Analysis of Paracetamol and Tramadol in a Pharmaceutical Dosage Form, *E-Journal of Chemistry* 2012, 9, 1347-1356.
- [185] Karunakaran, K, Navaneethan, G, Elango, K P, Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Paracetamol, Tramadol HCl and Domperidone in a Combined Dosage Form, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2012, 11, 99-106.
- [186] Chitravathi, S, Munichandraiah, N, Voltammetric determination of paracetamol, tramadol and caffeine using poly(Nile blue) modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2016, 764, 93-103.
- [187] Glavanovic, S, Glavanovic, M, Tomisic, V, Simultaneous quantitative determination of paracetamol and tramadol in tablet formulation using UV spectrophotometry and chemometric methods, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 2016, 157, 258-264.
- [188] Ciurba, A, Hancu, G, Cojocea, L M, Sipos, E, Todoran, N, Development of new formulation and its evaluation by capillary electrophoresis of tablets containing tramadol hydrochloride and paracetamol, *Pharmaceutical Development and Technology* 2014, 19, 833-838.
- [189] Borkar, D, Godse, V, Bafana, Y, Bhosale, A, Tal-Purandar, D-P, Simultaneous estimation of paracetamol and promethazine hydrochloride in pharmaceutical

- formulations by a RP-HPLC method, *Int. J. ChemTech Res. CODEN (USA)* 2009, 2, 667-670.
- [190] Chen, D-X, Zhang, J-R, Determination the Content of Pediatric Paracetamol and Promethazine Tablets by HPLC [J], *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy* 2008, 2, 022.
- [191] Sawant, R L, Ahmed, R, Supriya, R S, Sheetal, D R, Spectrophotometric estimation of paracetamol and promethazine in tablet dosage forms, *Der Pharma Chemica* 2012, 4, 714-719.
- [192] Lin, L, Application of signal multiplier derivative spectrophotometry and equivalent derivate derivative spectrophotometry to the determination of promethazine and paracetamol in xiretong injection, *Acta Pharmaceutica Sinica* 1988, 1, 009.
- [193] Yehia, A M, El-Rahman, M K A, Application of normalized spectra in resolving a challenging Orphenadrine and Paracetamol binary mixture, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.* 2015, 138, 21-30.
- [194] Srathaphut, L, Ruangwises, N, Determination of paracetamol and orphenadrine citrate in pharmaceutical tablets by modeling of spectrophotometric data using partial least-squares and artificial neural networks, *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2007, 127, 1723-1729.
- [195] Arayne, M S, Sultana, N, Siddiqui, F A, Simultaneous Determination of Paracetamol and Orphenadrine Citrate in Dosage Formulations and in Human Serum by RP-HPLC, *Journal of the Chinese Chemical Society* 2009, 56, 169-174.
- [196] Nejem, L, Antakli, S, Bagdashe, H, Spectrophotometric Determination of Paracetamol and Orphenadrine Citrate in Tablet, *Asian Journal of Chemistry* 2013, 25, 1079-1082.
- [197] Deroco, P B, Vicentini, F C, Fatibello, O, An Electrochemical Sensor for the Simultaneous Determination of Paracetamol and Codeine Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Nickel Oxide Nanoparticles and Carbon Black, *Electroanalysis* 2015, 27, 2214-2220.
- [198] Santos, A M, Vicentini, F C, Deroco, P B, Rocha, R C, Fatibello, O, Square-Wave Voltammetric Determination of Paracetamol and Codeine in Pharmaceutical and Human Body Fluid Samples Using a Cathodically Pretreated Boron-Doped Diamond Electrode, *J. Braz. Chem. Soc.* 2015, 26, 2159-2168.
- [199] Khanmohammadi, M, Soleimani, M, Morovvat, F, Garmarudi, A B, Khalafbeigi, M, Ghasemi, K, Simultaneous determination of paracetamol and codeine phosphate in tablets by TGA and chemometrics, *Thermochimica Acta* 2012, 530, 128-132.

- [200] Toral, M I, Richter, P, Martinez, O, Simultaneous determination of paracetamol and codeine by first order derivative spectrophotometry, *Boletín De La Sociedad Chilena De Química* 1996, 41, 283-289.
- [201] Capella-Peiro, M E, Bose, D, Rubert, M F, Esteve-Romero, J, Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2006, 839, 95-101.
- [202] Tiselius, A, *The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins.* -Uppsala 1930. 107 S. 4^o (Nova Acta Reg. Societatis scient. Upsaliensis. Ser. 4, vol. 7,4), Almqvist & Wiksell 1930.
- [203] Xuan, X, Li, D, Analytical study of Joule heating effects on electrokinetic transportation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2005, 1064, 227-237.
- [204] Knox, J H, McCormack, K A, Temperature effects in capillary electrophoresis. 1: Internal capillary temperature and effect upon performance, *Chromatographia* 1994, 38, 207-214.
- [205] Hjerten, S, Free zone electrophoresis, *Chromatographic Reviews* 1967, 9, 122-219.
- [206] Hjerten, S, High-performance electrophoresis - the electrophoretic counterpart of high-performance liquid-chromatography, *Journal of Chromatography* 1983, 270, 1-6.
- [207] Mikkers, F E P, Everaerts, F M, Verheggen, T, Concentration distributions in free zone electrophoresis, *Journal of Chromatography* 1979, 169, 1-10.
- [208] Jorgenson, J W, Lukacs, K D, Capillary zone electrophoresis, *Science* 1983, 222, 266-272.
- [209] Jorgenson, J W, Lukacs, K D, Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries, *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298-1302.
- [210] Heiger, D N, *High Performance Capillary Electrophoresis.* Hewlett Packard Company, 1997. Publication Number 12-5091-6199E.
- [211] Silva, J A F d, Coltro, W K T, Carrilho, E, Tavares, M F M, Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares, *Química Nova* 2007, 30, 740-744.
- [212] Konášová, R, Dyrtrtová, J J, Kašička, V, Study of solvent effects on the stability constant and ionic mobility of the dibenzo-18-crown-6 complex with potassium ion by affinity capillary electrophoresis, *Journal of Separation Science* 2016, 39, 4429-4438.

- [213] Eugênio, P d F M, Carrilho, E, Evaluation of capillaries with different inner coatings for DNA analysis using dilute polymer solutions by capillary electrophoresis, *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, 1833-1840.
- [214] Macka, M, Yang, W-C, Zakaria, P, Shitangkoon, A, Hilder, E F, Andersson, P, Nesterenko, P, Haddad, P R, Poly (tetrafluoroethylene) separation capillaries for capillary electrophoresis: Properties and applications, *J. Chromatogr. A* 2004, 1039, 193-199.
- [215] Whatley, H, in: Petersen, J. R., Mohammad, A. A. (Eds.), *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, Humana Press, Totowa, NJ 2001, pp. 21-58.
- [216] Zanolli Filho, L A, Desenvolvimento de metodologias alternativas para o controle de qualidade de anti-retrovirais em medicamentos utilizando eletroforese capilar. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, University of São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46133/tde-31102007-103414/>>. Acesso em: 08/04/2017.
- [217] Fuguet, E, Ràfols, C, Bosch, E, Rosés, M, Fast high-throughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis: I. Monoprotic weak acids and bases, *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 3646-3651.
- [218] Tavares, M F, Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Química nova* 1997, 20, 493-511.
- [219] Terabe, S, Matsubara, N, Ishihama, Y, Okada, Y, Microemulsion electrokinetic chromatography - comparison with micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography* 1992, 608, 23-29.
- [220] Segato, M P, Silva, C R, Jardim, I C S F, *Eletrocromatografia capilar: Contextualização, estado da arte e perspectivas*, Química Nova 2009.
- [221] Colton, I J, Carbeck, J D, Rao, J, Whitesides, G M, Affinity capillary electrophoresis: A physical-organic tool for studying interactions in biomolecular recognition, *Electrophoresis* 1998, 19, 367-382.
- [222] Carvalho, A Z, Aplicação de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato à determinação de espécies neutras. 2003. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46133/tde-10072008-103654/>>. Acesso em: 08/04/2017.

- [223] Henderson, R K, Baker, A, Murphy, K, Hambly, A, Stuetz, R, Khan, S, Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: a review, *Water research* 2009, 43, 863-881.
- [224] Freitas, J M, Oliveira, T d C, Gimenes, D T, Munoz, R A A, Richter, E M, Simultaneous determination of three species with a single-injection step using batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection, *Talanta* 2016, 146, 670-675.
- [225] Mark, J J, Scholz, R, Matysik, F-M, Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 45-64.
- [226] Sisk, G D, Herzog, G, Glennon, J D, Arrigan, D W, Assessment of ion transfer amperometry at liquid–liquid interfaces for detection in CE, *Electrophoresis* 2009, 30, 3366-3371.
- [227] da Silva, J A F, Detecção eletroquímica em eletroforese capilar, *Química Nova* 2003, 26, 56-64.
- [228] 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* 2011, 32, 939-946.
- [229] Marra, M C, Cunha, R R, Vidal, D T R, Munoz, R A A, do Lago, C L, Richter, E M, Ultra-fast determination of caffeine, dipyrone, and acetylsalicylic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection and identification of degradation products, *J. Chromatogr. A* 2014, 1327, 149-154.
- [230] Šolínová, V, Kašička, V, Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis, *Journal of Separation Science* 2006, 29, 1743-1762.
- [231] Zemann, A J, Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 2003, 24, 2125-2137.
- [232] Beutner, A, Cunha, R R, Richter, E M, Matysik, F M, Combining C4D and MS as a dual detection approach for capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 2016.
- [233] Haque, A, Stewart, J T, Simultaneous determination of codeine, caffeine, butalbital, and aspirin by free solution capillary electrophoresis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1999, 22, 1193-1204.
- [234] Pumera, M, Analysis of explosives via microchip electrophoresis and conventional capillary electrophoresis: A review, *Electrophoresis* 2006, 27, 244-256.
- [235] Nehme, R, Lascaux, A, Delepee, R, Claude, B, Morin, P, Capillary electrophoresis procedure for the simultaneous analysis and stoichiometry determination of a drug and

- its counter-ion by using dual-opposite end injection and contactless conductivity detection: Application to labetalol hydrochloride, *Anal. Chim. Acta* 2010, 663, 190-197.
- [236] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- [237] Carr, G P, Wahlich, J C, A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1990, 8, 613-618.
- [238] Lawson, G M, Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus, *Clinical chemistry* 1994, 40, 1218-1219.
- [239] Armbruster, D A, Tillman, M D, Hubbs, L M, Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs, *Clinical chemistry* 1994, 40, 1233-1238.
- [240] Fracassi da Silva, J A, do Lago, C L, Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector, *ELECTROPHORESIS* 2000, 21, 1405-1408.
- [241] Fracassi da Silva, J A, do Lago, C L, An oscillometric detector for capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 1998, 70, 4339-4343.
- [242] Brito-Neto, J G A, da Silva, J A F, Blanes, L, do Lago, C L, Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals, *Electroanalysis* 2005, 17, 1198-1206.
- [243] Brito-Neto, J G A, da Silva, J A F, Blanes, L, do Lago, C L, Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics, *Electroanalysis* 2005, 17, 1207-1214.
- [244] Elbashir, A A, Aboul-Enein, H Y, Recent applications and developments of capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C4D) in capillary electrophoresis, *Biomed. Chromatogr.* 2014, 28, 1502-1506.
- [245] Elbashir, A A, Schmitz, O J, Aboul-Enein, H Y, Application of Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection (CE-C4D): an update, *Biomed. Chromatogr.* 2017.
- [246] Kubáň, P, Hauser, P C, Contactless conductivity detection for analytical techniques—Developments from 2014 to 2016, *Electrophoresis* 2016.

- [247] Coelho, L H, Gutz, I G, Automation of an analysis system with microvolume porous membrane sampling, capillary electrophoresis separation and contactless conductivity detection for near-real-time monitoring of traces of low-molecular-weight carboxylic acids in air, *J. Braz. Chem. Soc.* 2011, 22, 2157-2164.
- [248] Coltro, W K T, Lima, R S, Segato, T P, Carrilho, E, de Jesus, D P, do Lago, C L, da Silva, J A F, Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems-ten years of development, *Analytical Methods* 2012, 4, 25-33.
- [249] Gabriel, E F, dos Santos, R A, Lobo-Júnior, E O, Rezende, K C, Coltro, W K, Hydrodynamic injection on electrophoresis microchips using an electronic micropipette, *Talanta* 2017, 162, 19-23.
- [250] Francisco, K J M, do Lago, C L, A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector, *Electrophoresis* 2009, 30, 3458-3464.
- [251] Cunha, R R, Gimenes, D T, Munoz, R A, do Lago, C L, Richter, E M, Simultaneous determination of diclofenac and its common counter-ions in less than 1 minute using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 2013, 34, 1423-1428.
- [252] Ding, W, Thornton, M J, Fritz, J S, Capillary electrophoresis of anions at high salt concentrations, *ELECTROPHORESIS* 1998, 19, 2133-2139.
- [253] Vinther, A, Sørensen, H, Mathematical model describing dispersion in free solution capillary electrophoresis under stacking conditions, *J. Chromatogr. A* 1991, 559, 3-26.
- [254] Burgi, D S, Chien, R L, Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 1991, 63, 2042-2047.
- [255] Lian, D-S, Zhao, S-J, Li, J, Li, B-L, Progress in stacking techniques based on field amplification of capillary electrophoresis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2014, 406, 6129-6150.
- [256] Quirino, J P, Kim, J-B, Terabe, S, Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 2002, 965, 357-373.
- [257] Marsh, A, Altria, K, Use of multiplexed CE for pharmaceutical analysis, *Chromatographia* 2006, 64, 327-333.
- [258] Opekar, F, Coufal, P, Štulík, K, Rapid Capillary Zone Electrophoresis Along Short Separation Pathways and Its Use in Some Hyphenated Systems: A Critical Review, *Chemical Reviews* 2009, 109, 4487-4499.

- [259] Matysik, F-M, Advances in fast electrophoretic separations based on short capillaries, *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010, 397, 961-965.
- [260] Grossman, P D a C, J. C., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Paul D. Grossman and Joel C. Colburn (Eds.) Academic Press, Inc., San Diego, California, USA, 1992, 352 pp., ISBN 0-12-304250-X, *Electrophoresis* 1993, 14, 559-559.
- [261] Montes, R H, Marra, M C, Rodrigues, M M, Richter, E M, Muñoz, R A, Fast determination of ciprofloxacin by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Electroanalysis* 2014, 26, 432-438.
- [262] Micke, G A, Costa, A C O, Heller, M, Barcellos, M, Piovezan, M, Caon, T, de Oliveira, M A L, Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol - Total analysis time reduction strategies, *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 7957-7961.
- [263] Laborde-Kummer, E, Gaudin, K, Joseph-Charles, J, Gheyouche, R, Boudis, H, Dubost, J-P, Development and validation of a rapid capillary electrophoresis method for the determination of oseltamivir phosphate in Tamiflu® and generic versions, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2009, 50, 544-546.
- [264] Piovezan, M, Costa, A C O, Jager, A V, de Oliveira, M A L, Micke, G A, Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples, *Anal. Chim. Acta* 2010, 673, 200-205.
- [265] da Silva, J A F, de Castro, N V, de Jesus, D P, Faria, A F, De Souza, M V N, de Oliveira, M A L, Fast determination of ethambutol in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 2010, 31, 570-574.
- [266] Cherkaoui, S, Geiser, L, Veuthey, J L, Rapid separation of basic drugs by nonaqueous capillary electrophoresis, *Chromatographia* 2000, 52, 403-407.
- [267] Costa, A C O, da Silva Perfeito, L, Tavares, M F, Micke, G A, Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities, *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 123-127.
- [268] Site da internet disponível em <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/lc/IC%20L387.pdf>, acessado em 03/07/2017.
- [269] Site da internet disponível em <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/87447-PO-IICS-API-Counterion-CAD-18Oct2010-LPN2610-01.pdf>, acessado em 03/07/2017.

- [270] Calisevici, M N, Perju, D M, Lysandrou, M C, Dumitrel, G A, Glevitzky, M, Determination of anion and cation contents in Cyprus drinking waters by HPIC method, *Journal of Food Agriculture & Environment* 2011, 9, 65-68.
- [271] Meng, H-B, Wang, T-R, Guo, B-Y, Hashi, Y, Guo, C-X, Lin, J-M, Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography, *Talanta* 2008, 76, 241-245.
- [272] Crafts, C, Bailey, B, Plante, M, Acworth, I, Evaluation of Methods for the Simultaneous Analysis of Cations and Anions Using HPLC with Charged Aerosol Detection and a Zwitterionic Stationary Phase, *Journal of Chromatographic Science* 2009, 47, 534-539.
- [273] Saari-Nordhaus, R, Anderson, J M, Simultaneous analysis of anions and cations by single-column ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1991, 549, 257-264.
- [274] 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, *J. Chromatogr. A* 2002, 964, 227-241.
- [275] Weekley, B S, Foley, J P, Dual-opposite-injection CZE: Theoretical aspects and application to organic and pharmaceutical compounds, *Electrophoresis* 2007, 28, 697-711.
- [276] Lopez, C, Nehme, R, Claude, B, Morin, P, Max, J P, Pena, R, Pelissou, M, Ribet, J P, A Convenient Approach to Simultaneous Analysis of a Pharmaceutical Drug and Its Counter-Ion by CE Using Dual-Opposite End Injection and Contactless Conductivity Detection, *Chromatographia* 2012, 75, 25-32.
- [277] Durkin, D, Foley, J P, Dual-opposite injection electrokinetic chromatography for the unbiased, simultaneous separation of cationic and anionic compounds, *Electrophoresis* 2000, 21, 1997-2009.
- [278] Padaruskas, A, Paliulionyte, V, Pranaityte, B, Single-Run Capillary Electrophoretic Determination of Inorganic Nitrogen Species in Rainwater, *Anal. Chem.* 2001, 73, 267-271.
- [279] Xu, L, Dong, X-Y, Sun, Y, Novel poly(vinyl alcohol)-based column coating for capillary electrophoresis of proteins, *Biochemical Engineering Journal* 2010, 53, 137-142.
- [280] Zhou, M X, Foley, J P, Dual opposite injection electrokinetic chromatography: Nonionic microemulsion pseudostationary phase and novel approach to electrokinetic sampling bias, *Electrophoresis* 2004, 25, 653-663.

- [281] Padaruskas, A, Dual-opposite injection capillary electrophoresis for the simultaneous separation of anionic and cationic compounds, *Curr. Anal. Chem.* 2005, 1, 149-156.
- [282] Priego-Capote, F, de Castro, M D L, Dual injection capillary electrophoresis: Foundations and applications, *Electrophoresis* 2004, 25, 4074-4085.
- [283] Tanyanyiwa, J, Leuthardt, S, Hauser, P C, Electrophoretic separations with polyether ether ketone capillaries and capacitively coupled contactless conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 2002, 978, 205-211.
- [284] Mai, T D, Hauser, P C, Simultaneous separations of cations and anions by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection employing a sequential injection analysis manifold for flexible manipulation of sample plugs, *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 266-272.
- [285] Bächmann, K, Haumann, I, Groh, T, Simultaneous determination of inorganic cations and anions in capillary zone electrophoresis (CZE) with indirect fluorescence detection, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1992, 343, 901-902.
- [286] Gaudry, A J, Guijt, R M, Macka, M, Hutchinson, J P, Johns, C, Hilder, E F, Dicoski, G W, Nesterenko, P N, Haddad, P R, Breadmore, M C, On-line simultaneous and rapid separation of anions and cations from a single sample using dual-capillary sequential injection-capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 2013, 781, 80-87.
- [287] Johns, C, Yang, W C, Macka, M, Haddad, P R, Simultaneous separation of anions and cations by capillary electrophoresis with high magnitude, reversed electroosmotic flow, *J. Chromatogr. A* 2004, 1050, 217-222.
- [288] Gallagher, P A, Danielson, N D, Capillary electrophoresis of cationic and anionic surfactants with indirect conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 1997, 781, 533-540.
- [289] Foret, F, Fanali, S, Ossicini, L, Bocek, P, Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr.* 1989, 470, 299-308.
- [290] Shamsi, S A, Danielson, N D, Individual and simultaneous class separations of cationic and anionic surfactants using capillary electrophoresis with indirect photometric detection, *Anal. Chem.* 1995, 67, 4210-4216.
- [291] Ribeiro, M M, Oliveira, T C, Batista, A D, Muñoz, R A, Richter, E M, A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc, *J. Chromatogr. A* 2016, 1472, 134-137.
- [292] Tomoyoshi, S, Ross, G A, Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1999, 834, 65-71.

- [293] Sarazin, C, Delaunay, N, Varenne, A, Costanza, C, Eudes, V, Gareil, P, Simultaneous capillary electrophoretic analysis of inorganic anions and cations in post-blast extracts of acid-aluminum mixtures, *Journal of Separation Science* 2010, 33, 3177-3183.
- [294] Krokhin, O V, Hoshino, H, Shpigun, O A, Yotsuyanagi, T, Use of cationic polymers for the simultaneous determination of inorganic anions and metal-4-(2-pyridylazo)resorcinolato chelates in kinetic differentiation-mode capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1997, 776, 329-336.
- [295] Tangen, A, Lund, W, Frederiksen, R B, Determination of Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺ in mixtures of seawater and formation water by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1997, 767, 311-317.
- [296] Belgrader, P, Devaney, J M, Del Rio, S A, Turner, K A, Weaver, K R, Marino, M A, Automated polymerase chain reaction product sample preparation for capillary electrophoresis analysis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996, 683, 109-114.
- [297] Clarke, N J, Tomlinson, A J, Schomburg, G, Naylor, S, Capillary isoelectric focusing of physiologically derived proteins with on-line desalting of isotonic salt concentrations, *Anal. Chem.* 1997, 69, 2786-2792.
- [298] Green, J S, Jorgenson, J W, Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary zone electrophoresis by the addition of alkali metal salts to the buffers, *J. Chromatogr. A* 1989, 478, 63-70.
- [299] Oefner, P J, Bonn, G K, Huber, C G, Nathakarnkitkool, S, Comparative study of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography in the analysis of oligonucleotides and DNA, *J. Chromatogr. A* 1992, 625, 331-340.
- [300] Stover, F S, Haymore, B L, McBeath, R J, Capillary zone electrophoresis of histidine-containing compounds, *J. Chromatogr. A* 1989, 470, 241-250.
- [301] Okafo, G, Harland, G, Camilleri, P, Enhanced resolution in the fingerprinting of short-chain oligonucleotides using the dodecasodium salt of phytic acid in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 1996, 68, 1982-1986.
- [302] Bushey, M M, Jorgenson, J W, Capillary electrophoresis of proteins in buffers containing high concentrations of zwitterionic salts, *J. Chromatogr. A* 1989, 480, 301-310.
- [303] Coelho, A G, Aguiar, F P, Jesus, D P d, A rapid and simple method for determination of 5-hydroxytryptophan in dietary supplements by capillary electrophoresis, *J. Braz. Chem. Soc.* 2014, 25, 783-787.

- [304] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº899, de 29/05/2003.
- [305] Mathew, M, Gupta, V D, Bethea, C, Quantitation of Promethazine Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Forms Using High Performance Liquid Chromatography, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1994, 20, 1693-1698.
- [306] Bosáková, Z, Kloučková, I, Tesařová, E, Study of the stability of promethazine enantiomers by liquid chromatography using a vancomycin-bonded chiral stationary phase, *Journal of Chromatography B* 2002, 770, 63-69.
- [307] Underberg, W J M, Oxidative degradation of pharmaceutically important phenothiazines III: Kinetics and mechanism of promethazine oxidation, *J. Pharmac. Sci.* 1978, 67, 1133-1138.
- [308] Meyer, V R, *Practical high-performance liquid chromatography*, John Wiley & Sons 2013.

7 Trabalhos desenvolvidos no período

7.1 Artigos publicados no período

1. Cunha, R. R.; Ribeiro, M. A. C.; Munoz R. A. A.; Richter E. M., Fast analytical method for the determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol using capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection CE-C⁴D. (DOI: 10.1002/jssc.201601275).
2. Beutner, Andrea; Cunha, Rafael Rodrigues ; Richter, Eduardo Mathias ; Matysik, Frank-Michael . Combining C⁴D and MS as a dual detection approach for capillary electrophoresis. *Electrophoresis (Weinheim. Print)*, v. 37, p. n/a-n/a, 2016.
3. Richter, Eduardo M. ; Tormin, Thiago F. ; Cunha, Rafael R.; Silva, Weberson P. ; Pérez-Junquera, Alejandro ; Fanjul-Bolado, Pablo ; Hernández-Santos, David ; Muñoz., Rodrigo A. A. . A Compact Batch Injection Analysis Cell for Screen Printed Electrodes: A Portable

Electrochemical System for On-site Analysis. *Electroanalysis* (New York, N.Y.), v. 28, p. 1856-1859, 2016.

4. Montes, Rodrigo H.O. ; Lima, Ana P. ; Cunha, Rafael R. ; Guedes, Tiago J. ; Dos Santos, Wallans T.P. ; Nossol, Edson ; Richter, Eduardo M. ; Munoz, Rodrigo A.A. . Size effects of multi-walled carbon nanotubes on the electrochemical oxidation of propionic acid derivative drugs: Ibuprofen and naproxen. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 775, p. 342-349, 2016.
5. Squissato, André L. ; Fernandes, David M. ; Sousa, Raquel M. F. ; Cunha, Rafael R. ; Serqueira, Dalyelli S. ; Richter, Eduardo M. ; Pasquini, Daniel ; Muñoz, Rodrigo A. A. . Eucalyptus pulp as an adsorbent for biodiesel purification. *Cellulose*, v. 22, p. 1263-1274, 2015.
6. Cunha, Rafael R.; Chaves, Sandro C. ; Ribeiro, Michelle M. A. C. ; Torres, Livia M. F. C. ; Muñoz, Rodrigo A. A. ; Santos, Wallans T. P. Dos ; Richter, Eduardo M. . 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 (Print)*, v. 38, p. 1657-1662, 2015.
7. Serqueira, Dalyelli S. ; Fernandes, David M. ; Cunha, Rafael R. ; Squissato, André L. ; Santos, Douglas Q. ; Richter, Eduardo M. ; Munoz, Rodrigo A.A. . Influence of blending soybean, sunflower, colza, corn, cottonseed, and residual cooking oil methyl biodiesels on the oxidation stability. *Fuel (Guildford)*, v. 118, p. 16-20, 2014.
8. Marra, Mariana Cardoso ; Cunha, Rafael Rodrigues ; Vidal, Denis Tadeu Rajh ; Munoz, Rodrigo Alejandro Abarza ; Lago, Claudimir Lucio Do ; Richter, Eduardo Mathias . Ultra-fast determination of caffeine, dipyrone, and acetylsalicylic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection and identification of

- degradation products. *Journal of Chromatography (Print)*, v. 1327, p. 149-154, 2014.
9. Pereira, Polyana Fernandes ; Marra, Mariana Cardoso ; Cunha, Rafael Rodrigues ; Da Silva, Weberson Pereira ; Munoz, Rodrigo Alejandro Abarza ; Richter, Eduardo Mathias . Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 713, p. 32-38, 2014.
 10. Tormin, Thiago F. ; CUNHA, R. R. ; RICHTER, E. M. ; Munoz, Rodrigo A. A. . Combination Of Screen Printed Electrodes And Batch Injection Analysis: A Simple, Robust, High-Throughput, and portable electrochemical system.. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, v. 202C, p. 93-98, 2014.
 11. Lima, A. B. ; Faria, E. O. ; Cunha, R. R. ; Montes, R. H. O. ; Richter, E. M. ; Munoz, R. A. A. ; Santos, W. T. P. . Electrochemical Oxidation of Ibuprofen and Its Voltammetric Determination at a Boron-Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis (New York, N.Y.)*, v. 25, p. 1585-1588, 2013.
 12. Cunha, R. R.; Gimenes, D. T. ; Do Lago, C. L. ; Munoz, R. A. A. ; Richter, E. M. . Simultaneous determination of diclofenac and its common counterions in less than 1 minute using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis (Weinheim. Print)*, v. 34, p. 1423-1428, 2013.
 13. Gimenes, Denise Tofanello ; Cunha, Rafael Rodrigues ; De Carvalho Ribeiro, Michelle Miranda Araújo ; Pereira, Polyana Fernandes ; Muñoz, Rodrigo Alejandro Abarza ; Richter, Eduardo Mathias . Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac. *Talanta (Oxford)*, v. 116, p. 1026-1032, 2013.

14. Lima, Ana Paula De ; Stefano, Jessica S. ; Montes, Rodrigo H. O. ; Cunha, Rafael R. ; Silva, Luiz A. J. ; Richter, Eduardo M. ; Muñoz, Rodrigo A. A. . Electrochemical Oxidation of Chlorhexidine and its Amperometric Determination by Flow-Injection Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 00, p. 1-5, 2013.

15. Cunha, R. R.; Tormin, T. F. ; Richter, E. M. ; Munoz, R. A. A. . Determinação rápida de hidroquinona usando análise por injeção em batelada (BIA) com detecção amperométrica. *Química Nova (Impresso)*, v. 36, p. 663-668, 2013.

7.2 Artigos em redação

1. Cunha, R. R.; Ribeiro, M. A. C.; Munoz R. A. A.; Richter E. M., *Fast analytical method for the determination of dipyrone, pyridoxine, acetyl salicylic acid, diclofenac, ascorbic acid, naproxen, caffeine and paracetamol using capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection CE-C⁴D*. (artigo em redação).