

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).”

MARIANA CARDOSO MARRA

Tese de Doutorado

Uberlândia

Agosto de 2018

MARIANA CARDOSO MARRA

“Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de fármacos 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 de doutorado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Domingues Batista

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia

Agosto de 2018

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

M358d
2018 Marra, Mariana Cardoso, 1988-
Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D) [recurso eletrônico] / Mariana Cardoso Marra. - 2018.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.

Coorientador: Alex Domingues Batista.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.806>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Eletroforese capilar. 3. Fármacos. 4. Química analítica. I. Richter, Eduardo Mathias (Orient.). II. Batista, Alex Domingues (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



**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 83/PPQUI.**

DATA: 23/08/2018

DISCENTE: Mariana Cardoso Marra

MATRÍCULA: 11413QMI006

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação de hidroclorotiazida em combinação com 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 quatorze horas do dia vinte e três de agosto do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório A do Bloco 50 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Sidnei Gonçalves da Silva, da(o) do Instituto de Química da UFU, Anizio Marcio de Faria, da Universidade Federal de Uberlândia, Lúcia Helena Gomes Coelho, da Universidade Federal do ABC, Lucas Blanes, da Fundação Osvaldo Cruz e Alex Domingues Batista, professor(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 no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS SIMPLES E RÁPIDOS PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS POR ELETRÓFORESE 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 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva

Profª Dra. Lúcia Helena Gomes Coelho

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Prof. Dr. Lucas Blanes

Orientador(a): Prof. Dr. Alex Domingues Batista

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

(Los Hermanos)

Ao meu pai Donizete, meu anjo que está no céu, por ter me dado forças para que eu continuasse o meu caminho.

À minha mãe Nilza por todo o seu apoio e por sempre acreditar em mim.

Ao meu marido Tiago por todo incentivo, companheirismo e compreensão.

Às minhas duas princesas, Rafaela e Maria, que são a motivação para que eu nunca desista.

Aos meus dois irmãos, Marielle e Fabiano, por serem os meus melhores amigos.

Ao meu orientador, Eduardo, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência em me ensinar, pela compreensão e por sempre acreditar que eu fosse capaz.

A todos os amigos que conquistei durante esses anos, obrigada pela parceria e pelos momentos de alegrias.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades encontradas e me mostrar o caminho nas horas incertas.

Ao meu pai Donizete, que partiu durante o período de realização deste trabalho deixando uma enorme tristeza e vazio, mas que continuou me dando força e me motivando à correr atrás dos meus sonhos.

À toda minha família Marra, por todo amor e incentivo. Em especial, minha mãe Nilza e meus irmãos Marielle e Fabiano, muito obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao meu marido Tiago, pelo companheirismo, paciência, motivação, compreensão e por sempre vibrar com as minhas conquistas.

Às minhas filhas, Rafaela e Maria, que me motivam diariamente a ser uma pessoa melhor e mais perseverante.

Ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo Mathias Richter, por acreditar em mim, por ser meu exemplo de profissional e por todo ensinamento durante todos esses anos de parceria. Muito obrigada também por compreender as minhas ausências devido à maternidade.

Ao prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, por todas as contribuições em meu aprendizado durante o doutorado, pelo apoio dado na realização deste trabalho e pela amizade.

Ao prof. Dr. Alex Batista, pela dedicação e ajuda na reta final de realização deste trabalho.

Aos amigos do NUPE, Brenda, Michelle, Thiago Costa, Luiz André, Jhonys, Ana Paula, Jéssica, Raquel, Rafael e Weberson. Agradeço a cada um de vocês pela colaboração nos trabalhos e pelos momentos de descontração que tornaram as minhas horas de trabalho menos cansativas. Agradeço também aos amigos que já fizeram parte do NUPE, Polyana, Denise, Rodrigo (banana), Rafaela (pisqua), Daly, David, Thiago, Gracy e Poliana. Obrigada por fazerem parte da minha vida, estarão pra sempre em meu coração.

Às minhas amigas que estão sempre presentes em minha vida, torcendo por mim, Nathália, Thalyta, Fernanda, Daniela, Nádhia, Pâmela, Talitha, Larissa, Flor, Fran e Aninha. Muito obrigada pelas palavras de força, incentivo e pelos momentos de alegria. Que Deus eternize nossas amizades.

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

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

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

RESUMO

No presente trabalho, a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D) foi usada para o desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação de princípios ativos em amostras farmacêuticas. O eletrólito (BGE) composto de 10 mmol L⁻¹ de TRIS e 10 mmol L⁻¹ de TAPS (pH 8,4) foi usado para a análise de formulações farmacêuticas contendo: amoxicilina (AMX) + clavulanato (CLA) + potássio (K). Outro BGE composto de 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico ajustado com hidróxido de sódio (pH = 9) foi usado para a análise de amostras farmacêuticas contendo: (a) hidroclorotiazida (HCT) + losartana (LOS) + potássio (K); (b) HCT + atenolol (ATE); (c) HCT + metoprolol (MET); (d) HCT + propranolol (PRO); (e) HCT + valsartana (VAL); (f) HCT + benazepril (BEN); (g) HCT + captopril (CAP); (h) HCT + enalapril (ENA); (i) HCT + lisinopril (LIS); (j) HCT + ramipril (RAM). Todos os métodos analíticos propostos são rápidos com menos de 1 minuto de análise e apresentam baixos desvios padrão relativo em relação as áreas dos picos (<4,6%) e tempos de migração (<1,7%), bem como resoluções adequadas (> 1,3) entre os sinais analíticos de cada espécie. As curvas de calibração para todas as espécies quantificadas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,995. Os métodos propostos apresentaram os seguintes limites de detecção (LOD / μmol L⁻¹): AMX = 25, CLA = 5, K = 4 (KCLA), HCT = 10, LOS = 3, K = 4 (KLOS), ATE = 3, MET = 4, PRO = 5, VAL = 14, BEN = 5, CAP = 7, ENA = 5, LIS = 5 e RAM = 6. Os resultados obtidos com o método proposto para análise de amostras farmacêuticas comerciais contendo AMX+CLA+K e HCT+LOS+K foram comparadas com os obtidos por HPLC e fotometria de chama (K). Os valores de t calculados (teste t-Student pareado), com nível de confiança de 95%, foram menores que o valor crítico (4,303, n = 3) em todas as análises, o que indica que não houve diferença significativa entre os resultados encontrados com o método proposto e HPLC. Os métodos apresentaram resultados satisfatórios nos testes de recuperação (92% a 106%). Além disso, os métodos são simples, de baixo custo (equipamento e manutenção), geram uma quantidade mínima de resíduos (métodos analíticos verdes) e possuem alta frequência analítica (> 75 injeções h⁻¹).

Palavras chave: amoxicilina, clavulanato de potássio, hidroclorotiazida, losartana potássica, atenolol, metoprolol, propranolol, valsartana, benazepril, captopril, enalapril, lisinopril, ramipril, eletroforese capilar, detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente, fármacos, análises rápidas.

ABSTRACT

In this work, capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) was used for the development of fast methods for determination of active principles in pharmaceutical samples. The background electrolyte (BGE) composed of 10 mmol L⁻¹ of TRIS and 10 mmol L⁻¹ of TAPS (pH 8.4) was used for the analysis of pharmaceutical formulations containing: amoxicillin (AMX) + clavulanate (CLA) + potassium (K). Another BGE composed of 10 mmol L⁻¹ of boric acid adjusted with sodium hydroxide (pH = 9) was used for the analysis of pharmaceutical samples containing: (a) hydrochlorothiazide (HCT) + losartan (LOS) + potassium (K); (b) HCT + atenolol (ATE); (c) HCT + metoprolol (MET); (d) HCT + propranolol (PRO); (e) HCT + valsartan (VAL); (f) HCT + benazepril (BEN); (g) HCT + captopril (CAP); (h) HCT + enalapril (ENA); (i) HCT + lisinopril (LIS); (j) HCT + ramipril (RAM). All proposed analytical methods are fast with duration less than 1 minute and presented low relative standard deviations in relation to peak area (< 4.6%) and migration times (< 1.7%), as well as adequate resolutions (> 1.3) between the analytical signals of each species. Calibration curves for all quantified species showed correlation coefficients greater than 0.995. The proposed methods showed the following limits of detection (LOD / $\mu\text{mol L}^{-1}$): AMX = 25, CLA = 5, K = 4 (KCLA), HCT = 10, LOS = 3, K = 4 (KLOS), ATE = 3, MET = 4, PRO = 5, VAL = 14, BEN = 5, CAP = 7, ENA = 5, LIS = 5 and RAM = 6. The results obtained with the proposed method for analysis of commercial pharmaceutical samples containing AMX+CLA+K and HCT+LOS+K were compared with those obtained by HPLC and flame photometry (K). The calculated t-values (paired t-Student test), with confidence level of 95%, were smaller than the critical value (4.303, n = 3) in all the analyses, which indicates that there were no significant differences between the results found with the proposed method and HPLC. The proposed methods presented satisfactory results in the recovery test (92% to 106%). Furthermore, the methods are simple, low cost (equipment and maintenance), generate a minimum amount of waste (green analytical methods), and have a high analytical frequency (> 75 injections h⁻¹).

Keywords: amoxicillin, clavulanate potassium, hydrochlorothiazide, losartan potassium, atenolol, metoprolol, propranolol, valsartana, benazepril, captopril, enalapril, lisinopril, ramipril capillary electrophoresis, contactless capacitive coupled conductivity detection, drugs, fast analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da AMX (pKa = 2,4; 7,4; 9,0 e 10,3).....	25
Figura 2. Fórmula estrutural do CLA (pKa = 2,7 e 12,2).	26
Figura 3. Fórmula estrutural da LOS (pKa = 3,9 e 5,9) e da HCT (pKa = 9,1; 9,8 e 11,3).....	27
Figura 4. Esquema de separação por CZE, sob EOF normal, de diferentes cátions.....	36
Figura 5. Representação esquemática da parede do capilar de sílica com o EOF normal.....	41
Figura 6. Representação esquemática da migração de moléculas neutras de tamanhos diferentes (N, N', N'') e íons de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.	42
Figura 7. Representação esquemática da parede do capilar com o EOF invertido.	43
Figura 8. Perfil de fluxo gerado por pressão (a), típico da técnica de HPLC e fluxo gerado pelo EOF (b), típico da técnica de CE, e suas correspondentes zonas de amostras.....	44
Figura 9. Representação esquemática de um sistema básico de CE.	45
Figura 10. Esquema do sistema de detecção C ⁴ D. E ₁ e E ₂ são os dois eletrodos do sistema de detecção.....	57
Figura 11. Imagem do equipamento (A) usado no laboratório e esquema do sistema CE-C ⁴ D (B).	63
Figura 12. Distribuição das espécies vs pH para AMX.	69
Figura 13. Distribuição das espécies vs pH para CLA.....	70
Figura 14. Eletroferogramas obtidos no estudo do efeito da composição do BGE na separação de K, AMX e CLA.....	71
Figura 15. Eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção utilizando uma solução padrão contendo AMX e KCLA (500 µmol L ⁻¹).....	73
Figura 16. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KCLA e AMX e suas respectivas relações de sinal versus concentração.....	74

Figura 17. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KCLA e AMX (a – e: 200 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as suas respectivas curvas de calibração (n =3).....	75
Figura 18. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com injeções sucessivas (n = 10) de uma solução padrão contendo KCLA e AMX.....	76
Figura 19. Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão e amostra de KCLA e AMX. Concentração dos analitos: 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de KCLA e AMX.....	77
Figura 20. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo 1 mmol L^{-1} de KCLA antes (A) e depois (B) da exposição à luz solar por 24 h.....	80
Figura 21. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo 1 mmol L^{-1} de KCLA dissolvido em 0,1 mol L^{-1} de H_2SO_4 durante 24 h sem (A) e com (B) a adição de mais 1 mmol L^{-1} de KCLA	81
Figura 22. Eletroferogramas obtidos no 1º e 2º detector a partir da injeção de soluções padrão contendo 1 mmol L^{-1} de KCLA dissolvido em 0,1 mol L^{-1} de NaOH durante 24 h sem (A) e com (B) a adição de mais 1 mmol L^{-1} de KCLA	82
Figura 23. Curva da relação de carga versus pH da molécula de LOS.....	85
Figura 24. Curva da relação de carga versus pH da molécula de HCT.....	86
Figura 25. Eletroferogramas obtidos com a variação de pH na separação de K, HCT e LOS por CZE.....	87
Figura 26. Eletroferogramas obtidos com a variação da composição do BGE na separação de K, LOS e HCT por CZE.....	89
Figura 27. Eletroferogramas obtidos em diferentes concentrações do BGE utilizando uma solução padrão de KLOS e HCT.....	90
Figura 28. Eletroferogramas obtidos em diferentes potenciais de separação utilizando uma solução padrão de KLOS e HCT.....	91

Figura 29. Eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção utilizando soluções padrões contendo KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e respectivos gráficos mostrando a relação do tempo de injeção com a área dos picos..	92
Figura 30. Eletroferogramas obtidos no primeiro (A) e segundo (C) detectores a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS (a – i: $52 - 1300 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (a – i: $20 - 500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e as respectivas relações de concentração e sinal dos analitos no primeiro (B) e segundo (D) detector (n = 3).	94
Figura 31. Eletroferogramas obtidos no primeiro (A) e segundo (B) detectores para o estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$).	96
Figura 32. Eletroferogramas obtidos no primeiro (A) e segundo (B) detector de uma solução padrão e amostra contendo KLOS+HCT...	98
Figura 33. Eletroferogramas obtidos no primeiro detector de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS + HCT e suas respectivas curvas de calibração (n = 3).	99
Figura 34. Eletroferogramas obtidos no segundo detector de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS + HCT e suas respectivas curvas de calibração (n = 3).	100
Figura 35. Eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo: (A) HCT ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATE ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MET ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$).	107
Figura 36. Eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo: (A) HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL ($653 \mu\text{mol L}^{-1}$).	108
Figura 37. Eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo: (A) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA ($188 \mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (E) HCT ($350 \mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM ($117 \mu\text{mol L}^{-1}$).	109

Figura 38. Comparação entre os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo: (A) HCT (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ATE (400 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT (75 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e MET (131 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções preparadas a partir de amostras com composições similares.....	112
Figura 39. Comparação entre os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo: (A) HCT (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e KLOS (650 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL (870 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções preparadas a partir de amostras com composição similares.....	113
Figura 40. Comparação entre os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo: (A) HCT (450 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA (188 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (E) HCT (350 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM (117 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções preparadas a partir de amostras com composição similares.	114
Figura 41. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão compostas por: (A) HCT (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ATE (400 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e MET (175 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	115
Figura 42. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por: (A) HCT (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e KLOS (650 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL (653 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	116
Figura 43. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por: (A) HCT (225 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA (125 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM (84 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	117
Figura 44. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ATE (100-600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração..	121

Figura 45. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de MET (88-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração..	121
Figura 46. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de PRO (100-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração..	122
Figura 47. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS (130-780 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração.....	123
Figura 48. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (50-400 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL (218-1740 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração..	124
Figura 49. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (75-750 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN (50-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração..	124
Figura 50. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (100-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP (200-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração.....	125
Figura 51. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (50-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA (63-1250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração..	125
Figura 52. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (50-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS (50-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração.	126
Figura 53. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (150-800 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM (50-267 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura molecular e outras características físicas e química de HCT, ATE, MET, PRO, LOS, VAL, BEN, CAP, ENA, LIS e RAM.	29
Tabela 2. Alguns analitos em diferentes matrizes e seus respectivos tempos de análise utilizando CE sob condições rápidas de separação.	49
Tabela 3. Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.	51
Tabela 4. Relação de reagentes usados no trabalho e empresas onde foram adquiridos.	61
Tabela 5. Características analíticas do método proposto.	77
Tabela 6. Determinação de AMX, CLA e K em formulações farmacêuticas por CE-C ⁴ D, HPLC-UV e fotometria de chama (FP) (valor ± SD; n = 3).	78
Tabela 7. Valores obtidos para as áreas dos picos de K e CLA antes e após a exposição à luz solar.	80
Tabela 8. Comparação das características das técnicas HPLC e CE-C ⁴ D.	83
Tabela 9. Resolução entre os picos de HCT e LOS em função do pH do BGE.	88
Tabela 10. Área do pico e resolução apresentadas na separação das espécies K, HCT e LOS em diferentes BGEs.	89
Tabela 11. Resolução apresentada na separação das espécies HCT e LOS em relação ao potencial de separação.	91
Tabela 12. Relação dos parâmetros operacionais otimizados do método de determinação de K, LOS e HCT por CE-C ⁴ D.	93
Tabela 13. Características analíticas do método proposto (valor ± SD).	97
Tabela 14. Determinação de K, HCT e LOS em formulações farmacêuticas por CE-C ⁴ D (valor ± SD; n = 3).	101
Tabela 15. Quantidade comumente encontrada de HCT na presença de outros princípios ativos.	106

Tabela 16. Resolução obtida para os analitos no primeiro e segundo detector.....	111
Tabela 17. Características analíticas do método proposto (valor \pm SD).	119
Tabela 18. Resultados obtidos na determinação de HCT na presença de outros princípios ativos via CE-C ⁴ D versus valores encontrados na bula das formulações farmacêuticas (valor \pm SD). ..	128
Tabela 19. Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (valor \pm SD; n = 3).	130

LISTA DE ABREVIACOES

AMX – Amoxicilina

ARAI – Antagonista do receptor de angiotensina II

ATE – Atenolol

BEN – Benazepril

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

CAP – Captopril

C⁴D – Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (do inglês “*capacitively coupled contactless conductivity detection*”) ou detecção condutométrica sem contato

CE – Eletroforese capilar (do inglês “*capillary electrophoresis*”)

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

CG – Cromatografia gasosa (do inglês “*gas chromatography*”)

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

CHES – Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico

CIEF – Focalização isoelétrica capilar (do inglês “*capillary isoelectric focusing*”)

CITP – Isotacoforese capilar (do inglês “*capillary isotachopheresis*”)

CLA – Clavulanato

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês “*cetyltrimethylammonium bromide*”)

CZE – Eletroforese capilar de zona (do inglês “*capillary zone electrophoresis*”)

DCE – Dupla camada elétrica

ENA – Enalapril

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

FSCE – Eletroforese capilar em solução livre (do inglês “*free solution capillary electrophoresis*”)

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HCT – Hidroclorotiazida

HIS – Histidina

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

IECA – Inibidores da enzima conversora da angiotensina

KCLA – Clavulanato de potássio

KLOS – Losartana potássica

LIF – Fluorescência induzido por laser (do inglês “*laser induced fluorescence detection*”)

LIS – Lisinopril

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

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

LOS – Losartana

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

MET – Metoprolol

PRO – Propranolol

RAM – Ramipril

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês “*relative standard deviation*”)

SD – Desvio padrão (do inglês “*standard deviation*”)

SNR – Razão sinal-ruído (do inglês “*signal-noise ratio*”)

TAPS – ácido 3-(tris(hidroximetil)metilamino)propano-1-sulfônico

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

VAL – Valsartana

LISTA DE SÍMBOLOS

q – Carga

r – Coeficiente de correlação

l – Comprimento efetivo do capilar

L – Comprimento total do capilar

s – Desvio padrão absoluto

SB – Desvio padrão do branco

α – Grau de dissociação das espécies

b – Inclinação da curva analítica

w – Largura do pico

\bar{X} – Média dos sinais analíticos

μ_a – Mobilidade aparente

μ_{ep} – Mobilidade eletroforética

μ_{ef} – Mobilidade eletroforética efetiva

μ_{eo} – Mobilidade eletrosmótica

n – Número de espécies

ϵ_r – Permitividade da solução

ϵ_0 – Permitividade do vácuo

E – Potencial elétrico

ζ – Potencial zeta

r – Raio

R_s – Resolução

t_m – Tempo de migração

v_a – Velocidade aparente

v_{ep} – Velocidade eletroforética

v_{ef} – Velocidade eletroforética efetiva

v_{eo} – Velocidade eletrosmótica

η – Viscosidade do meio

LISTA DE EQUAÇÕES

$$RS = \frac{2(t_{mi} - t_{mi+1})}{(w_i + w_{i+1})} \quad \text{Equação 1}$$

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad \text{Equação 2}$$

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \times \mu_j \quad \text{Equação 3}$$

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

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_r \times \varepsilon_0 \times \zeta}{\eta} \quad \text{Equação 5}$$

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

$$v_a = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \quad \text{Equação 7}$$

$$v_a = (v_{ef} \pm v_{eo}) \quad \text{Equação 8}$$

$$\mu_a = \frac{lL}{tmE} \quad \text{Equação 9}$$

$$t_m = \frac{lL}{E(\mu_{ep} + \mu_{eo})} \quad \text{Equação 10}$$

$$LOD = 3 \frac{SB}{b} \quad \text{Equação 11}$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{|C_{final} - C_{amostra}|}{C_{adicionada} \times 100} \quad \text{Equação 13}$$

Sumário

1.	Introdução.....	22
1.1.	Considerações gerais	23
1.2.1.	Amoxicilina (AMX) e clavulanato de potássio (KCLA).....	24
1.2.2.	Losartana potássica (KLOS) e hidroclorotiazida (HCT).....	27
1.2.3.	Hidroclorotiazida (HCT) e suas associações	29
1.3.	Determinação simultânea de cátions e ânions	32
1.4.	Eletroforese capilar (CE)	33
1.4.1.	Histórico.....	33
1.4.2.	Modalidades de separação	34
1.4.2.1.	Eletroforese capilar de zona (CZE).....	35
1.4.3.	Migração das espécies.....	37
1.4.4.	Fluxo eletrosmótico (EOF)	38
1.4.5.	Instrumentação	44
1.4.5.1.	Introdução da amostra.....	45
1.4.6.	Vantagens e limitações	46
1.5.	Análises rápidas por CE.....	47
1.6.	Sistemas de detecção	49
1.6.1.	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C ⁴ D).....	56
2.	Objetivos.....	60
2.1.	Objetivo geral	60
2.2.	Objetivos específicos	60
3.	Parte experimental	61
3.1.	Reagentes e amostras	61
3.2.	Instrumentação.....	62
3.3.	Método para determinação de K, CLA e AMX por CE-C ⁴ D	65
3.3.1.	Estudo do BGE	65

3.3.2.	Estudo da degradação do CLA	65
3.4.	Método para determinação de HCT na presença de outros por CE-C ⁴ D.....	66
3.5.	Validação dos parâmetros analíticos dos métodos propostos	66
3.5.1.	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	66
3.5.2.	Linearidade	67
3.5.3.	Precisão	68
3.5.4.	Exatidão (ensaios de recuperação).....	68
4.	Resultados e discussões	69
4.1.	Determinação simultânea de AMX e KCLA.....	69
4.1.1.	Estudo da degradação do CLA	79
4.1.2.	Conclusões parciais.....	82
4.2.	Determinação simultânea de KLOS e HCT.....	84
4.2.1.	Conclusões parciais.....	102
4.3.	Determinação de HCT e outros princípios ativos.....	104
4.3.1.	Conclusões parciais.....	131
5.	Conclusões gerais e perspectivas futuras.....	132
6.	Referências Bibliográficas.....	134
7.	Trabalhos desenvolvidos no período.....	157

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

A quantificação dos princípios ativos em medicamentos é essencial para garantir a autenticidade e eficiência dos produtos introduzidos no mercado, evitando possíveis adulterações ou falsificações. As falsificações em produtos farmacêuticos envolvem a alteração da quantidade do princípio ativo, o que pode resultar na anulação do efeito do medicamento quando em quantidade reduzida ou levar à sérios problemas de saúde devido à superdosagem. Diante disto, fez se necessário o desenvolvimento de vários métodos analíticos, clássicos e instrumentais, para a determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas e não apenas em amostras biológicas. Dentre as principais características que estes métodos devem apresentar está a exatidão, pois dados analíticos não exatos podem levar a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis [1].

Devido ao seu alto nível de exatidão, robustez, reprodutibilidade e seletividade, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*High-performance liquid chromatography*”) é bastante utilizada, sendo recomendada pela Farmacopeia Americana para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas com a presença de mais de um princípio ativo em sua composição [2]. No entanto, a técnica também é conhecida por gerar uma grande quantidade de resíduos (principalmente solventes orgânicos) e geralmente apresenta uma baixa frequência analítica [3]. Além disso, um número limitado de farmácias de manipulação possui este equipamento, o que provavelmente está relacionado ao investimento necessário para aquisição, operação e manutenção do equipamento.

Nesse contexto, estudos para o desenvolvimento de novos métodos que apresentem alta frequência analítica, menor geração de resíduos, menor custo por análise, exatidão e que ainda permitem a determinação de cátions e ânions simultaneamente são de grande importância. Isto

pode permitir que empresas com menor poder aquisitivo (farmácias de manipulação, por exemplo) possam implantar estas metodologias em seus procedimentos de controle de qualidade [4].

1.2. Princípios ativos estudados

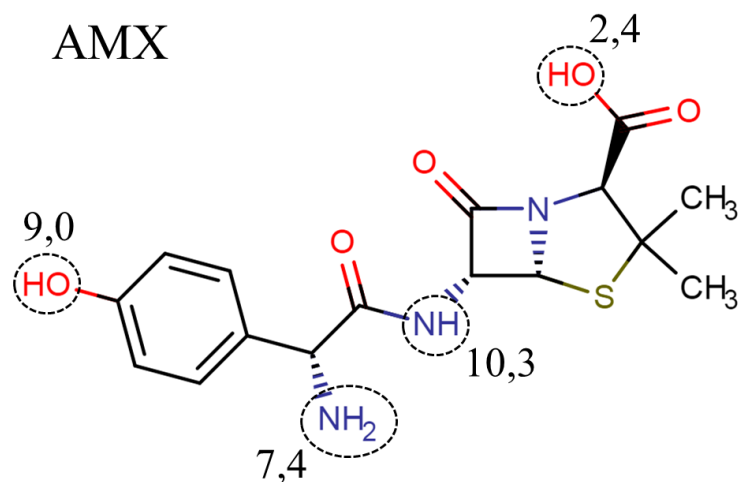
Em geral, dois ou mais princípios ativos são adicionados em uma mesma formulação farmacêutica devido ao fato de que o efeito farmacológico de um fármaco pode ser potencializado na presença de outro (sinergismo), ou ainda, o efeito obtido pela ingestão simultânea de fármacos é maior do que o obtido por cada um deles separadamente, trazendo uma maior eficácia ao tratamento [5].

No presente trabalho foram estudadas as seguintes diferentes formulações farmacêuticas: (i) amoxicilina (AMX) + clavulanato de potássio (KCLA); (ii) losartana potássica (KLOS) + hidroclorotiazida (HCT); (iii) HCT + atenolol (ATE); (iv) HCT + metoprolol (MET); (v) HCT + propranolol (PRO); (vi) HCT + valsartana (VAL); (vii) HCT + benazepril (BEN); (viii) HCT + captopril (CAP); (ix) HCT + enalapril (ENA); (x) HCT + lisinopril (LIS); (xi) HCT + ramipril (RAM).

1.2.1. Amoxicilina (AMX) e clavulanato de potássio (KCLA)

A amoxicilina (AMX), cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1, é um análogo da ampicilina, derivado do núcleo básico de penicilina (ácido 6-aminopenicilânico). É um antibiótico usado em todo o mundo e extremamente eficaz no tratamento de doenças respiratórias graves, infecções gastrointestinais, urinárias e cutâneas [6].

Figura 1. Fórmula estrutural da AMX ($pK_a = 2,4; 7,4; 9,0$ e $10,3$).

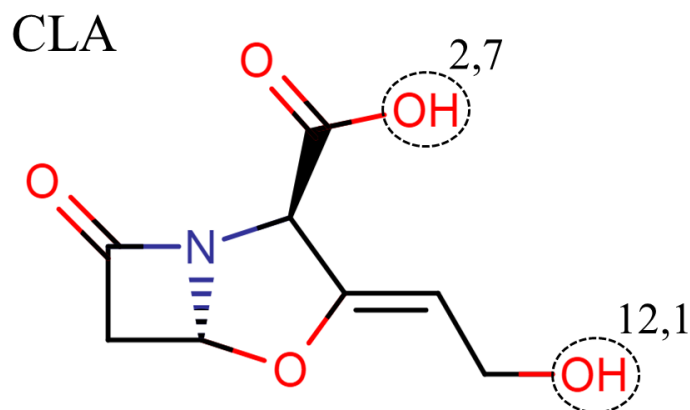


Fonte: Modificada de [7]

A AMX é propensa a degradação por bactérias produtoras de β -lactamases às quais são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina [8]. Por esse motivo, é frequentemente combinada com ácido clavulânico (CLA) para o tratamento de infecção causada por bactérias que são resistentes a AMX separadamente [6].

O CLA (Figura 2) é originalmente produzido pela fermentação de *Streptomyces clavuligerus* e administrado como um sal de potássio [9]. É um inibidor de uma grande variedade de β -lactamases bloqueando os locais ativos dessas enzimas, melhorando a atividade antimicrobiana da AMX e superando a resistência bacteriana. A mistura de AMX e clavulanato de potássio (KCLA) é o exemplo mais bem sucedido do uso de antibióticos β -lactâmicos [10].

Figura 2. Fórmula estrutural do CLA (pKa = 2,7 e 12,2).



Fonte: Modificada de [7]

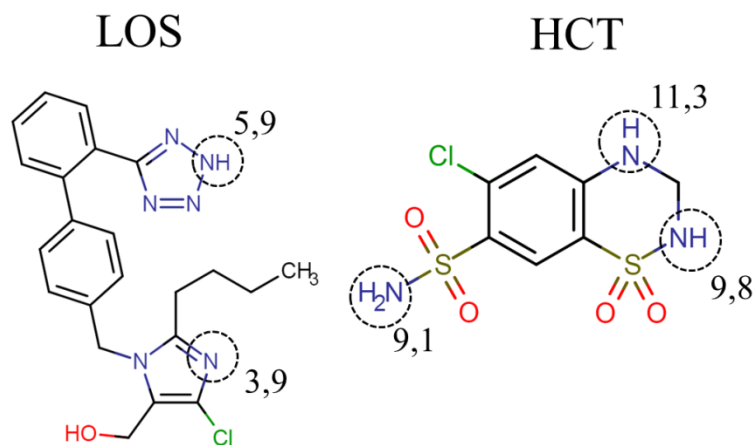
Para a determinação de AMX e CLA em formulações farmacêuticas, a Farmacopeia Americana indica a técnica de HPLC como método oficial [2]. Na literatura encontram-se alguns métodos de análise relacionados à determinação destes princípios ativos em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas envolvendo HPLC [11–15]. No entanto, estes métodos requerem alto tempo de análise (~ 10 min) e grande consumo de solventes (~ 10 mL por análise). Várias outras técnicas para a quantificação de AMX e CLA estão disponíveis na literatura, como a cromatografia em camada delgada acoplada a densitometria [16], eletroforese capilar (CE) [17,18], UPLC–MS/MS [19], reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR/FTIR) [20], espectrofotometria UV-Vis [10,21–23], quimiluminescência [9], potenciometria [22,24] e fluorimetria [25,26]. Entretanto, características como preparo de amostra simples, alta frequência analítica, consumo reduzido de reagentes e baixo custo não estão presentes simultaneamente na maioria destes métodos. Além disto, nenhum método que possibilite a determinação simultânea de clavulanato e potássio (estequiométrica) foi encontrado na literatura.

1.2.2. Losartana potássica (KLOS) e hidroclorotiazida (HCT)

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o problema mais comum na população adulta em todo o mundo sendo um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. A HAS é responsável por pelo menos 40% das mortes por acidente vascular cerebral, por 25% das mortes por doença arterial coronariana e, em combinação com o diabetes, 50% dos casos de insuficiência renal terminal. Um tratamento adequado da hipertensão leva a redução da morbidade e da mortalidade cardiovascular do paciente hipertenso, aumentadas em decorrência dos altos níveis tensionais. São utilizadas nesse caso tanto medidas não-medicamentosas isoladas como associadas a medicamentos anti-hipertensivos [27].

A losartana potássica (KLOS) (Figura 3) é um dos princípios ativos mais prescritos para o tratamento da hipertensão arterial, devido à sua maior especificidade, seletividade e tolerabilidade [28]. A administração de KLOS resulta na diminuição da resistência periférica total e do retorno venoso cardíaco [29]. Por outro lado, a HCT (Figura 3) é um composto diurético tiazídico, que aumenta a excreção renal de água e eletrólitos. Pode ser ainda utilizada no tratamento dos edemas associados com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática e com a terapia por corticosteróides ou estrógenos [30].

Figura 3. Fórmula estrutural da LOS (pKa = 3,9 e 5,9) e da HCT (pKa = 9,1; 9,8 e 11,3).



Fonte: Modificada de [7]

KLOS e HCT são utilizados separadamente ou combinados numa formulação farmacêutica para o tratamento de hipertensão e doenças cardiovasculares. Alguns pacientes hipertensos necessitam de tratamentos com fármacos que apresentam mecanismo de ação complementar com o objetivo de diminuir a pressão arterial. KLOS e HCT em uma dosagem combinada é considerado como um tratamento de primeira linha, preferido para a maioria dos pacientes, porque ambos os compostos foram considerados mais eficazes no tratamento da hipertensão em pacientes cuja pressão arterial não é adequadamente controlada por um único princípio ativo. Isto acontece devido ao efeito sinérgico e aditivo que estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona [3].

Devido à frequente prescrição de medicamentos contendo LOS e HCT, o desenvolvimento de métodos confiáveis para realizar a determinação destes princípios ativos é necessária. O método oficial recomendado pela Farmacopeia Americana [2] para a determinação individual de LOS e HCT envolve o uso de HPLC, mas ainda não existe em nenhuma farmacopeia um método para a determinação da mistura LOS+HCT. Por outro lado, estão descritos na literatura alguns métodos para a determinação simultânea de LOS e HCT em formulações farmacêuticas utilizando HPLC [28–31] e voltametria [3]. No entanto, os métodos que utilizam HPLC, geralmente requerem uso de grandes volumes de solventes orgânicos, as amostras necessitam de tratamento preliminar ou etapas de derivatização, alto custo de implementação, justificando assim o desenvolvimento de um método exato, rápido, simples e de baixo custo. Dois métodos utilizando CE com detecção UV [32,33] também foram relatados, no entanto, apresentam tempos de análise relativamente altos (> 7 min). Não foi encontrado na literatura nenhum método que possibilite a determinação de LOS e K simultaneamente.

1.2.3. Hidroclorotiazida (HCT) e suas associações

A HCT é prescrita sozinha ou muitas vezes em combinação com outros fármacos anti-hipertensivos. Associado ao seu baixo custo, fator importante numa terapia que se pode prolongar para o resto da vida, a HCT é um fármaco de primeira linha no controle da hipertensão. A HCT é comumente encontrada em associação com princípios ativos como atenolol (ATE), metoprolol (MET), propranolol (PRO), losartana (LOS), valsartana (VAL), benazepril (BEN), captopril (CAP), enalapril (ENA), lisinopril (LIS), ramipril (RAM) e outros, devido às potencialidades farmacológicas provenientes do efeito sinérgico obtido ao se consumir tais fármacos simultaneamente. Um resumo das propriedades físico-químicas das espécies estudadas neste trabalho está apresentado junto às suas fórmulas estruturais na Tabela 1.

Tabela 1. Estrutura molecular e outras características físicas e química de HCT, ATE, MET, PRO, LOS, VAL, BEN, CAP, ENA, LIS e RAM.

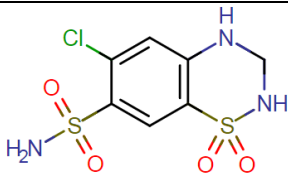
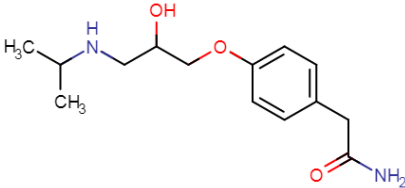
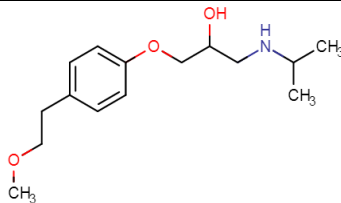
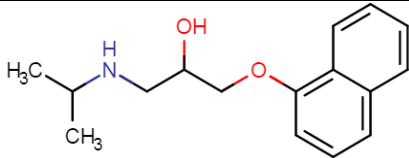
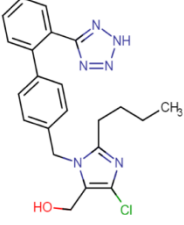
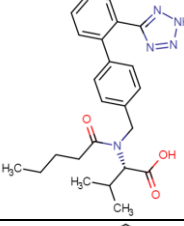
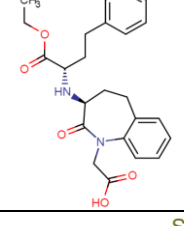
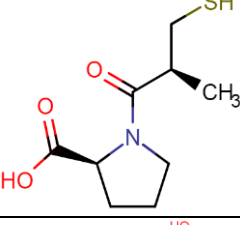
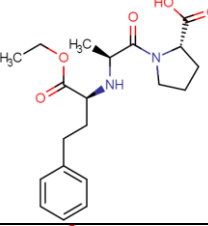
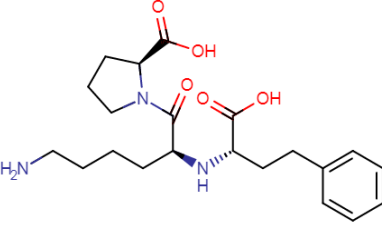
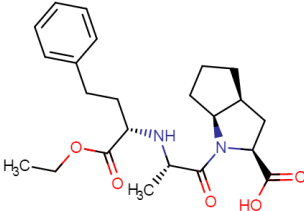
Analito	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Estruturas	pKa
HCT	297,7		9,1; 9,8; 11,3
ATE	266,3		9,7
MET	267,4		9,7
PRO	259,2		9,7

Tabela 1. Estrutura molecular e outras características físicas e química de HCT, ATE, MET, PRO, LOS, VAL, BEN, CAP, ENA, LIS e RAM (continuação).

LOS	422,9		3,9; 5,9
VAL	435,5		4,4; 7,4
BEN	424,5		3,5; 5,4
CAP	217,3		4,0; 10,1
ENA	376,5		3,7; 5,2
LIS	405,5		3,2; 3,9; 8,0; 10,21
RAM	416,5		3,8; 5,2

Fonte: Modificada de [7]

Os princípios ativos ATE, MET e PRO são fármacos pertencentes ao grupo dos beta-bloqueadores, uma classe de fármacos usada principalmente em doenças cardiovasculares. Os beta-receptores, quando estão ativados, produzem aumento da atividade cardíaca e induzem maior produção de noradrenalina. Quando estes fármacos bloqueiam esses receptores, há menor atividade cardíaca, causando diminuição da pressão arterial e do consumo de oxigênio pelo músculo cardíaco [34–36]. Na literatura estão disponíveis alguns métodos para a determinação simultânea destes compostos tais como HCT e ATE [34,37–49], HCT e MET [36,50–55] e HCT e PRO [35,56–60].

Os princípios ativos BEN, CAP, ENA, LIS e RAM são fármacos do tipo IECA (inibidores da enzima conversora da angiotensina), diminuem a resistência vascular periférica, promovendo uma diminuição da pressão arterial. São amplamente utilizados sozinhos ou em combinação com outros fármacos para o tratamento de hipertensão arterial e alguns casos de insuficiência cardíaca [61–65]. No mercado, são comercializados com HCT, pois podem melhorar a ação de substâncias hipotensivas permitindo uma diminuição da dose para evitar possíveis efeitos secundários. Na literatura encontram-se alguns métodos para a determinação simultânea destes compostos, tais como HCT e CAP [66–71], HCT e RAM [44,65,72,73], HCT e ENA [63,74–76], HCT e BEN [61,77–80], e HCT e LIS [64,81–83].

Assim como a LOS, a VAL [84] é um competitivo e específico antagonistas do receptor da angiotensina II (ARAI). É utilizada para os tratamentos de pressão alta, insuficiência cardíaca e pós-infarto do miocárdio em pacientes recebendo terapêutica usual. Atua bloqueando o efeito da angiotensina II, como resultado, as veias relaxam e a pressão sanguínea diminui. Assim como os outros hipertensivos, a superdose de VAL pode resultar em acentuada hipotensão que pode levar a uma depressão do nível de consciência, colapso circulatório e/ou choque [85]. Alguns métodos para a determinação simultânea de VAL na presença de HCT estão disponíveis na literatura [85–87].

1.3. Determinação simultânea de cátions e ânions

Na área farmacêutica, 50% das moléculas usadas como princípios ativos são administradas na forma de sais com o intuito de melhorar suas propriedades biológicas e físico-químicas como solubilidade, higroscopicidade, pH em solução, taxa de dissolução, ponto de fusão e estabilidade [88]. Sabendo que o controle de qualidade é indispensável para minimizar os problemas de saúde decorrentes do uso dos medicamentos, a determinação de princípios ativos e seus respectivos contra-íons podem trazer informações adicionais sobre a composição do medicamento, como a estequiometria do sal usado na formulação [89]. A determinação da estequiometria do sal pode trazer indícios da presença de impurezas na formulação farmacêutica ou também sobre a existência de processos de degradação/hidrólise do princípio ativo. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de métodos que permitam a separação simultânea de espécies aniônicas e catiônicas em CE é de grande interesse.

Na literatura foram encontrados trabalhos que fazem a determinação simultânea de cátions e ânions por HPLC, nos quais são usadas como fase estacionária resinas de troca catiônica e aniônica simultaneamente [90,91], ou colunas poliméricas de caráter anfótero [92]. Porém, o uso destas técnicas para análises simultâneas de cátions e ânions requer instrumentação complexa, injetores duplos e, muitas vezes, mais de um tipo de eluente e/ou coluna, aumentando o custo da análise [93].

A utilização de sistemas da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D) na determinação simultânea de cátions e ânions pode contornar os problemas citados acima e para isso algumas estratégias são usadas. Uma delas, e a mais relatada, foi introduzida por Kubán e Karlberg [94], consiste na injeção da amostra em ambas as extremidades do capilar com o detector normalmente posicionado próximo ao centro do capilar. Assim, os

cátions são injetados na extremidade anódica e os ânions na extremidade catódica. Com a aplicação da voltagem, cátions e ânions migram em sentidos opostos ao detector [95–98].

Outra estratégia bastante explorada é a utilização do sistema de CE regular e um EOF com alta velocidade de migração, a fim de mover os analitos catiônicos e aniônicos na mesma direção. Esta estratégia pode ser utilizada com o EOF normal ou com EOF invertido [99], desde que o EOF tenha grande magnitude (EOF com pH acima de 7) [100–103]. Por último, uma estratégia não tão comum, é a complexação de espécies catiônicas com um composto quelante obtendo espécies carregadas negativamente, as quais podem ser separadas de modo convencional (EOF invertido) juntamente com os demais analitos aniônicos [104–106].

1.4. Eletroforese capilar (CE)

1.4.1. Histórico

A eletroforese é definida como o movimento diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis quando estas estão submetidas a um campo elétrico. Foi introduzida pelo químico Arne Tiselius em 1937 como uma técnica de separação. Quando misturas de proteínas que compõe o soro sanguíneo foram colocadas em tubos preenchidos com soluções tampão e submetidas a aplicação de um campo elétrico, Tiselius verificou que os componentes da amostra migraram com direção e velocidade determinadas por suas cargas e massas. Por este trabalho, Tiselius foi premiado com o Prêmio Nobel de Química de 1948 [107].

A eficiência dos experimentos realizados pela eletroforese em solução livre, apresentada por Tiselius, era limitada devido à falta de habilidade na dissipação de calor, fenômeno conhecido como Efeito Joule [108]. O calor era dissipado somente pelas extremidades do recipiente gerando gradientes de temperatura acentuando de forma comprometedor a difusão das espécies. Além disso, o aquecimento do meio também possibilitava a degradação térmica do material biológico.

Hjérten, em 1967, introduziu uma alternativa para a técnica a fim de minimizar o aquecimento durante as separações [109]. Ele demonstrou a possibilidade de conduzir separações eletroforéticas em tubos sob rotação que tinham diâmetros internos da ordem de milímetros, permitindo a aplicação de potenciais de separação mais elevados.

Logo se percebeu a vantagem da utilização de tubos de diâmetro interno reduzido, nos quais a alta relação entre a área de contato e o volume interno favorece a dissipação de calor. Assim, durante o começo da década de 80, nos Estados Unidos, Jorgenson e Lukacs, apresentaram pela primeira vez a CE [110–112]. Nesse trabalho foram feitas discussões sobre efeitos que influenciam a dispersão de bandas e possibilidade de obtenção de separações de alta eficiência sob ação de um elevado campo elétrico, em uma coluna capilar de sílica fundida com 75 μm de diâmetro interno. Com isso, o efeito Joule que tanto prejudicava o desempenho da técnica de eletroforese foi praticamente anulado conseguindo-se alta eficiência e ótima resolução na separação das espécies.

A partir daí vieram contribuições no sentido de implementação instrumental da técnica e tem gradualmente se estabelecido como uma técnica alternativa e de suporte para HPLC por ser ambientalmente correta e de menor custo operacional [113,114]. Devido a possibilidade de aplicações aos mais variados tipos de substâncias e matrizes, a técnica despertou o interesse de vários grupos de pesquisa no mundo, elevando sua aplicabilidade a níveis jamais vistos, e, em 1987, foi lançado o primeiro equipamento comercial de CE. A importância da CE tornou-se evidente com o projeto genoma humano e, a partir de então, tem sido utilizada em análises de rotina em diversas áreas como forense, clínica, ambiental e farmacêutica.

1.4.2. Modalidades de separação

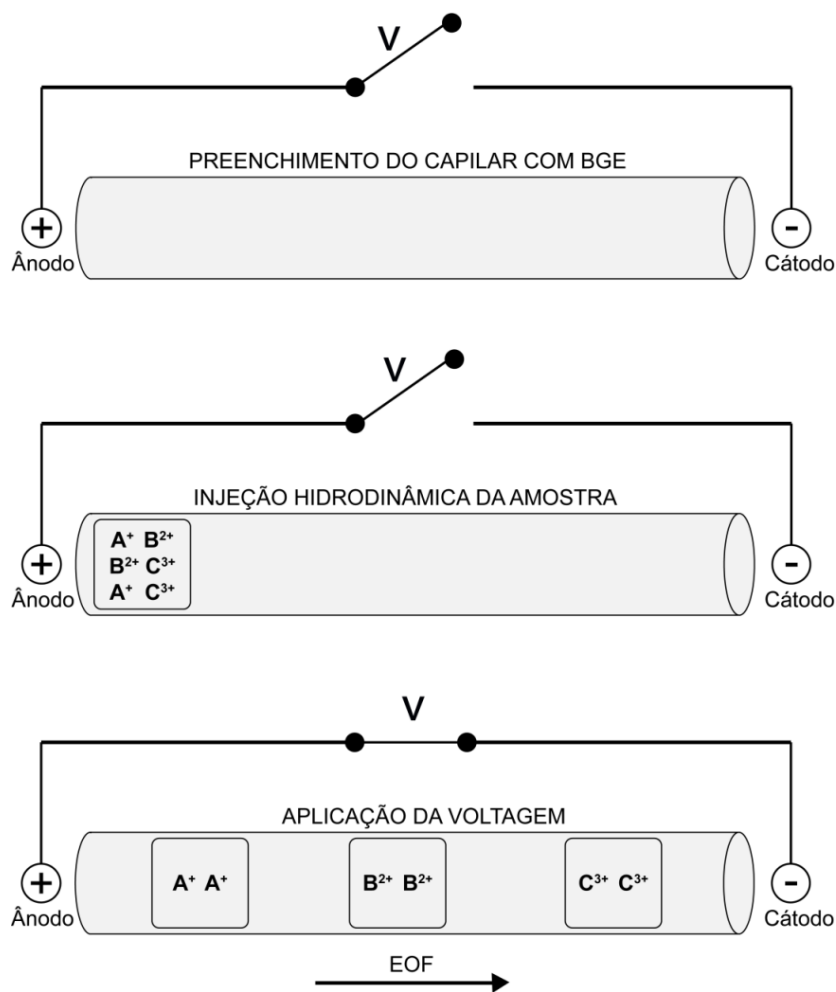
Várias modalidades de separações em CE foram propostos para contornar limitações das modalidades antes existentes. Esses vários modos possuem mecanismos singulares e tem

demonstrado serem técnicas eficientes de separação. Dentre os modos de operação da CE estão a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês “*capillary zone electrophoresis*”), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC, do inglês “*micellar electrokinetic chromatography*”), eletroforese capilar em gel (CGE, do inglês “*capillary gel electrophoresis*”), eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês “*capillary electrochromatography*”), isotacoforese capilar (CITP, do inglês “*capillary isotachopheresis*”) e focalização isoeletrica capilar (CIEF, do inglês “*capillary isoelectric focusing*”). Na literatura, informações sobre as modalidades de separação usadas em CE podem ser encontradas em diversos artigos [115–118]. Nesta tese será discutida apenas a CZE, uma vez que foi este o modo de separação utilizado neste trabalho..

1.4.2.1. Eletroforese capilar de zona (CZE)

A CZE, também conhecida como eletroforese capilar em solução livre (FSCE, do inglês “*free solution capillary electrophoresis*”), é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados, provavelmente devido à facilidade da sua implementação e otimização das condições experimentais [119]. Nesse modo de separação, o capilar é preenchido com um eletrólito de corrida (BGE, do inglês “*background electrolyte*”), geralmente com características tamponantes e a amostra é introduzida neste meio tamponado, como uma banda de pequena espessura. Quando um campo elétrico é aplicado, os analitos formam zonas distintas ao longo do capilar devido às suas diferenças de mobilidades [119,120]. Uma característica bastante atrativa dessa modalidade é que, através dela, é possível fazer a determinação de cátions e ânions simultaneamente [103,121,122]. A limitação dessa modalidade é que moléculas neutras não são separadas sem o uso de uma estratégia adicional, como por exemplo, a adição de um agente complexante ou derivatizações [123]. Um esquema de separação por CZE, sob fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “*electroosmotic flow*”) normal de diferentes cátions está representado na Figura 4.

Figura 4. Esquema de separação por CZE, sob EOF normal, de diferentes cátions.



Fonte: Modificada de [124]

A eficiência da separação por CZE pode ser determinada pela resolução (R_s), que verifica o quanto as substâncias de uma mistura estão separadas. Como mostrado na equação 1, sua magnitude está relacionada com o tempo de migração (t_{mi}) e a largura do pico (w_i) de duas espécies adjacentes.

$$R_s = \frac{2(t_{mi} - t_{mi+1})}{(w_i + w_{i+1})} \quad \text{Equação 1}$$

1.4.3. Migração das espécies

A abordagem teórica discutida a seguir é estritamente aplicável a CZE praticada em capilares de sílica fundida. As equações fundamentais de outros tipos de eletroforese devem incorporar suas particularidades como partição de soluto nas micelas, dependência do tamanho da molécula ou gradiente de pH.

A equação 2 mostra que a migração das espécies em CZE se dá devido ao conceito de mobilidade eletroforética (μ_{ep}), a qual é diretamente proporcional à carga (q) e inversamente proporcional a fatores de atrito, que estão relacionadas ao tamanho, ao raio hidratado do íon (r) e à viscosidade do meio (η) [125].

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad \text{Equação 2}$$

As espécies envolvidas na análise por CZE podem participar de reações de equilíbrio em função do pH do meio. Sob a condição de equilíbrio, estas espécies, parte ionizadas e outra parte sem cargas, movimentam-se como uma única banda, e, portanto, a mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) é dada pela somatória das mobilidades eletroforéticas (μ_j) de todas as n espécies relacionadas entre si por equilíbrios químicos, multiplicadas pela distribuição destas espécies (α_j), conforme pode ser observado na equação 3 [126]:

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \times \mu_j \quad \text{Equação 3}$$

Com a aplicação de um potencial elétrico (E), os íons adquirem velocidade chamada de velocidade eletroforética (v_{ep}). A velocidade eletroforética efetiva (v_{ef}) é dependente da mobilidade eletroforética do íon (μ_{ef}) e do campo elétrico (E) ao qual o íon é submetido durante a separação (Eq. 4):

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

Os valores de v_{ef} e μ_{ef} de uma mesma espécie variam dependendo de fatores como viscosidade, composição e pH do BGE. A adição de um agente complexante também pode promover mudança na mobilidade da espécie. Logo, se for feita uma escolha adequada do pH ou do agente complexante, espécies com mobilidades semelhantes presentes em uma mistura podem ser eficientemente separadas.

1.4.4. Fluxo eletrosmótico (EOF)

O fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês “*electroosmotic flow*”) é um fenômeno eletroforético capaz de provocar um fluxo do BGE dentro da coluna capilar e até mesmo substâncias neutras, que não são atraídas pelos pólos, podem ser deslocadas em direção ao detector [108]. A mobilidade do EOF (μ_{eo} - Eq. 5) é dependente de fatores como a permitividade da solução (ϵ_r), a permitividade do vácuo (ϵ_0), o potencial definido no plano de cisalhamento na região difusa, ou seja, o potencial zeta (ζ) e a viscosidade da solução (η) [125]:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_r \times \epsilon_0 \times \zeta}{\eta} \quad \text{Equação 5}$$

O ζ é essencialmente determinado pela superfície carregada da parede do capilar. Uma vez que esta carga é fortemente dependente do pH, a magnitude do EOF varia com o pH do BGE. O ζ também depende da concentração e força iônica do BGE, uma vez que eletrólitos com elevada força iônica promovem a compressão da dupla camada elétrica (DCE). Altas concentrações de BGE são úteis para limitar as interações de soluto com a parede do capilar, no entanto, o aquecimento dentro do capilar restringe o uso de concentrações elevadas. Concentrações típicas variam de 10 a 50 mmol L⁻¹, embora 100 a 500 mmol L⁻¹ também tenham sido usadas. Baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar causando alargamento e distorção das bandas e produzindo um EOF não reprodutível, o que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração, prejudicando a identificação dos solutos. A

magnitude do EOF também depende da temperatura, uma vez que a variação de 1° C promove uma variação de 2 a 3% na η da solução [125].

Quando aplicado o campo elétrico, o EOF adquire uma velocidade proporcional ao campo (Eq. 6):

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

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

$$v_a = (\mu_{ef} + \mu_{eo}) E \quad \text{Equação 7}$$

A equação 7 ainda pode ser descrita como:

$$v_a = (v_{ef} \pm v_{eo}) \quad \text{Equação 8}$$

Como pode ser verificado nas equações 7 e 8, se as espécies tiverem mobilidades no mesmo sentido da mobilidade do EOF, o tempo de análise em CZE será significativamente menor. Dependendo da grandeza e sentido do EOF, a espécie pode reverter o seu sentido de migração devido à força exercida pelo EOF, ficando claro que a migração das espécies em CE não depende apenas das próprias mobilidades, mas também da mobilidade do EOF. O EOF também permite que moléculas neutras se movam no interior da coluna capilar e, desta forma, tais moléculas passam a ter a mesma mobilidade e sentido do EOF (sem separação entre elas).

Como pode ser observado na equação 9, o tempo de migração (t_m), o comprimento efetivo do capilar (l), comprimento total do capilar (L) e o potencial aplicado (E) podem ser usados para calcular a mobilidade aparente (μ_a) de uma espécie.

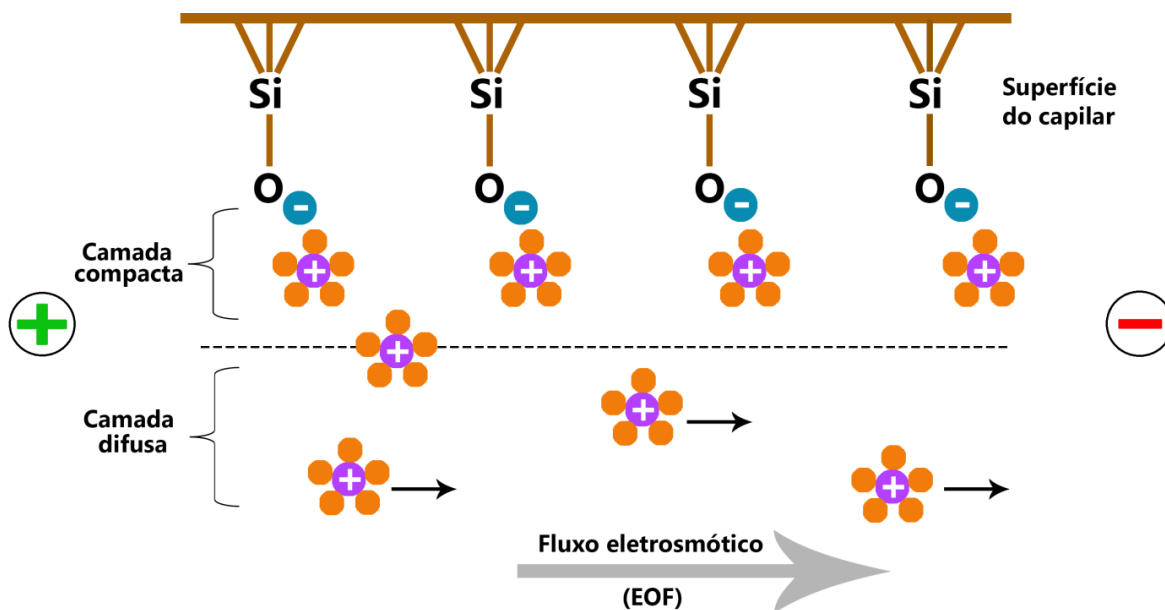
$$\mu_a = \frac{l L}{t_m E} \quad \text{Equação 9}$$

A mobilidade efetiva (μ_{ef}) da espécie pode ser extraída a partir da μ_a usando um marcador neutro, espécie que se move apenas conduzida pelo EOF.

Dentre os vários tipos de capilares usados em CE, o capilar de sílica fundida é atualmente o mais popular, pois possui dimensões de diâmetro precisas, resistência ao ataque químico, permite o emprego de uma alta tensão por ser um material dielétrico, possui um recobrimento de poliimida que lhe proporciona uma melhor resistência mecânica e grupos superficiais em sua parede. O interior do capilar de sílica contém grupos silanóis (SiOH), que se comportam como ácidos fracos de Lewis e a medida em que se tem um aumento do pH do BGE vão se desprotonando.

Sabendo que o pKa da sílica é em torno de 5,6 [127], o EOF torna-se significativo em pH acima de 4, pois os grupos silanóis são parcialmente desprotonados. Em pH 8, a ionização já é praticamente completa, assim, a superfície do capilar de sílica fica carregada negativamente e uma camada de cátions do tampão se posiciona junto a parede do capilar para manter o equilíbrio de cargas. Uma DCE, composta de camadas compacta e difusa, é então estabelecida em função da diferença de potencial (potencial zeta) gerada nesta região. Na camada compacta, as cargas negativas da superfície do capilar não se movimentam, logo reduz drasticamente a velocidade de migração dos cátions eletrostaticamente ligados à essas cargas, mas por outro lado, os cátions da camada difusa, fracamente ligados, migram em direção ao cátodo ao aplicar um potencial elétrico tangencial nesse sistema. Durante a migração, os cátions solvatados migram em direção ao cátodo transportando moléculas de água, induzindo a um fluxo de solução como um todo, conhecido como EOF normal [128]. Uma representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal está mostrado na Figura 5.

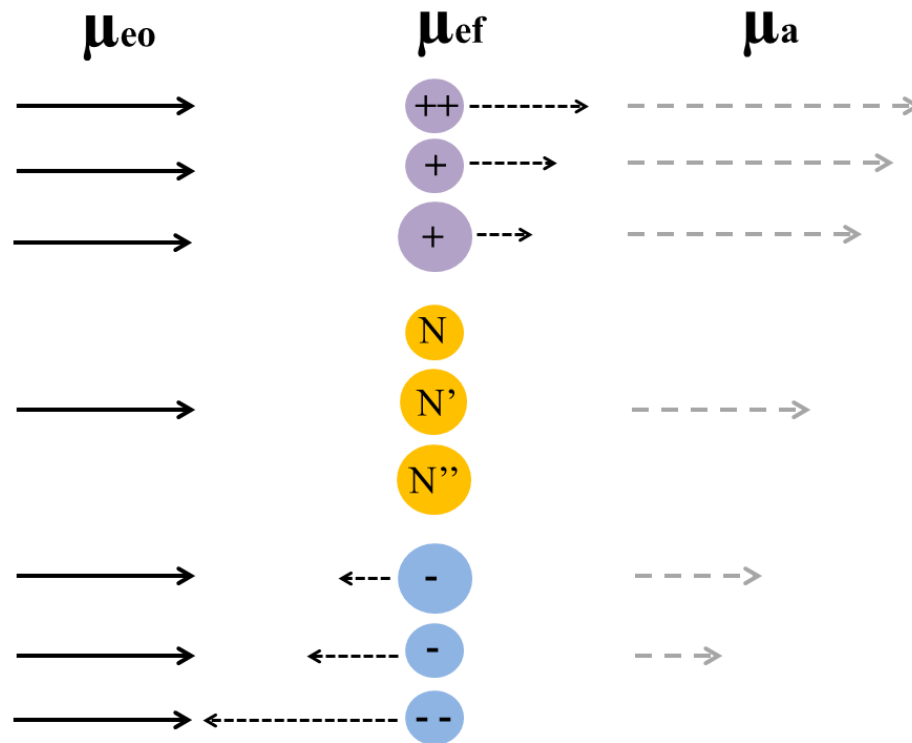
Figura 5. Representação esquemática da parede do capilar de sílica com o EOF normal.



Fonte: Próprio autor (2018)

Usando o EOF normal, ocorre uma migração líquida maior de cátions ($\mu_{ef} + \mu_{eo}$) em direção ao cátodo quando comparada a migração líquida de ânions ($\mu_{ef} - \mu_{eo}$) em direção ao ânodo. Normalmente, quando se trata de ânions de baixa mobilidade e na presença de EOF (BGE com pH > 6), por mais que estejam sendo atraídos pelo lado oposto (ânodo), conseguem ser “arrastados” pelo EOF normal (capilar de sílica sem modificação) e chegam ao detector logo após as moléculas neutras. Uma representação esquemática da migração das moléculas está mostrada na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática da migração de moléculas neutras de tamanhos diferentes (N , N' , N'') e íons de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.



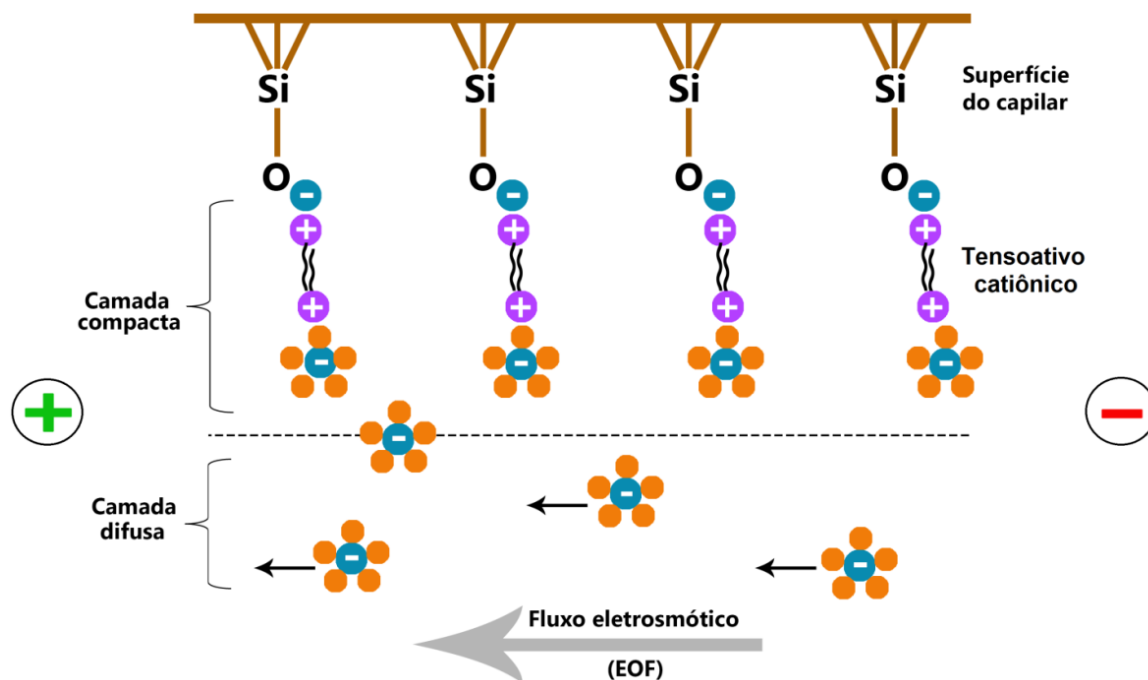
μ_{eo} : mobilidade eletrosmótica; μ_{ef} : mobilidade efetiva; μ_a : mobilidade aparente

Fonte: Modificada de [129]

Em CE, além de ser possível mudar a grandeza (velocidade) do EOF, também é possível mudar a sua direção. Essa estratégia é mais comumente empregada na análise de ânions, com isso, obtém-se melhor resolução e aumento da velocidade da análise, pois a velocidade eletroforética dos ânions e o EOF terão mesma direção. Para promover a inversão do fluxo, o método mais utilizado se baseia na adição de tensoativos catiônicos ao BGE, principalmente os derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa. A escolha adequada do tensoativo, assim como da sua concentração, permite o controle direto da magnitude do EOF. Quando o capilar sem modificação encontra-se carregado negativamente ($\text{pH} > 4$), com a adição deste inversor (surfactante catiônico), uma camada fortemente ligada formada por semi-micelas é adsorvida na superfície interna do capilar carregando a parede interna com cargas positivas. Nesse caso, são os

ânions do tampão que passam a fazer parte da dupla camada elétrica, os quais, sob a ação do campo elétrico se movem em direção ao ânodo (pólo positivo), definindo o chamado fluxo eletrosmótico invertido (Figura 7) [130].

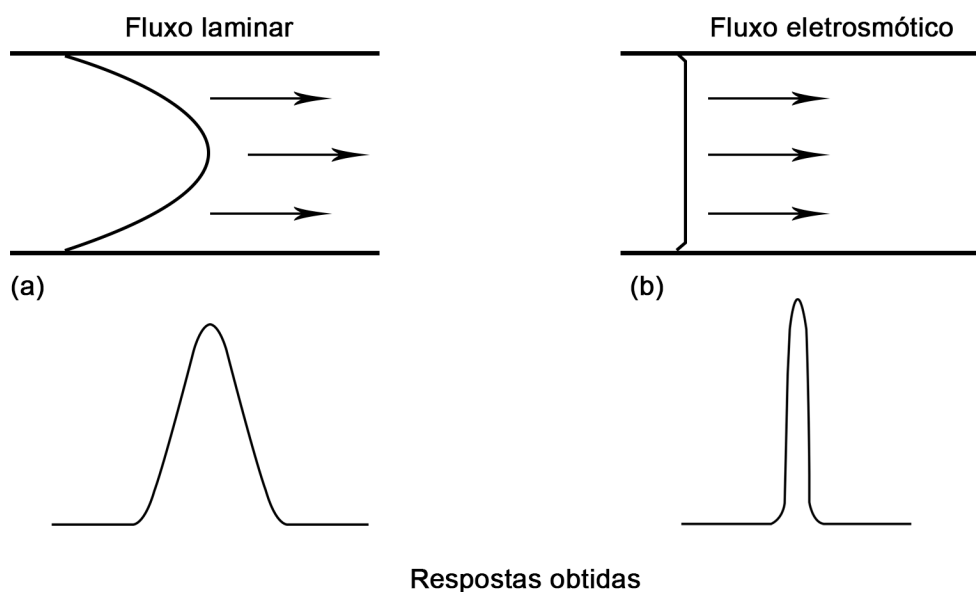
Figura 7. Representação esquemática da parede do capilar com o EOF invertido.



Fonte: Próprio autor (2018)

Uma característica única do EOF é o seu perfil planar (Figura 8), possibilitando uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo e tornando a CE uma técnica de maior eficiência de separação quando comparada a HPLC, a qual possui um fluxo laminar ou parabólico. Na presença do EOF, a análise é livre do efeito de parede presente no fluxo laminar gerado quando se tem fluídos impulsionados por pressão através de uma tubulação, nesse caso as espécies dos analitos no centro do capilar migram mais rapidamente que as espécies próximas à parede do tubo.

Figura 8. Perfil de fluxo gerado por pressão (a), típico da técnica de HPLC e fluxo gerado pelo EOF (b), típico da técnica de CE, e suas correspondentes zonas de amostras.



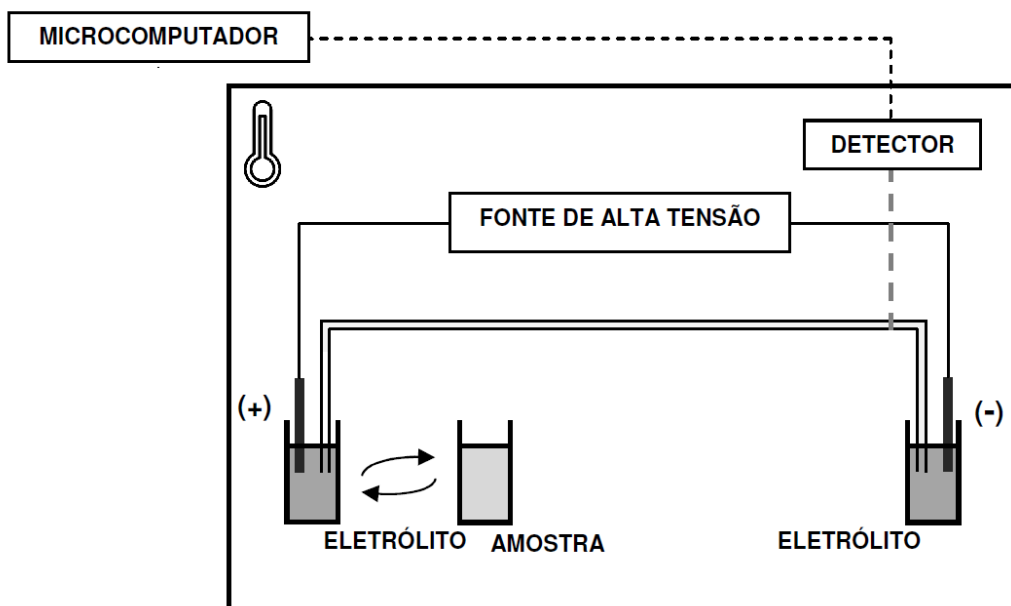
Fonte: Próprio autor (2018)

É de grande importância que o EOF seja controlado durante a separação. Se o fluxo variar, os tempos de migração irão variar, podendo causar identificações incorretas de picos ou erros na quantificação.

1.4.5. Instrumentação

O sistema básico de um equipamento de CE consiste de uma fonte de alta tensão (0-30 kV), capilares (sílica revestido com poliimida é o material mais utilizado), eletrodos (geralmente de platina), reservatórios para soluções (tipicamente de 1,5 a 2,0 mL) e um detector apropriado (Figura 9). Uma fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, através da conexão com os eletrodos, que são imersos em solução contendo o eletrólito (BGE). O sistema é termostatizado por circulação de um líquido ou ar, forçado através do cartucho contendo o capilar, ou usando ventiladores, para minimizar aquecimento. Os comandos para controle do equipamento, aquisição e tratamento de dados são realizados mediante interface com um computador [131,132].

Figura 9. Representação esquemática de um sistema básico de CE.



Fonte: Modificada de [124]

1.4.5.1. Introdução da amostra

As amostras e/ou padrões podem ser introduzidas no capilar por métodos hidrodinâmicos, aplicando um gradiente de pressão, e eletrocinéticos, através de um gradiente de potencial ao longo do capilar. A forma pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta nas análises quantitativas [108].

Na introdução hidrodinâmica o gradiente de pressão pode ser estabelecido por pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução ou por gravidade. O volume introduzido no capilar (na ordem de nL) é uma alíquota representativa da composição da amostra que depende do tempo de introdução, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. É usualmente mais precisa que a introdução eletrocinética porque baseia-se rigorosamente na transferência de volume.

Na introdução eletrocinética, a amostra é introduzida no capilar como resultado da combinação entre as velocidades eletroforéticas e eletrosmóticas. A quantidade de amostra introduzida depende da μ_{ef} do soluto, das condutividades da amostra e do BGE, assim como da magnitude do EOF. Como consequência, a amostragem discrimina os componentes da amostra em função de suas μ_{ef} , podendo não ser representativa da composição da amostra. Isto se torna um problema quando a amostra é composta de analitos de baixa mobilidade, que podem estar presentes em concentrações próximas ao limite de detecção. Sua maior aplicação é nas modalidades de eletroforese em que a injeção por transferência de volume é limitada (ex.: eletroforese em gel) ou na análise de traços em amostras de baixa força iônica [108].

1.4.6. Vantagens e limitações

Nos últimos anos, a CE tem chamado a atenção da comunidade científica, como sendo uma poderosa técnica para a separação e análise de compostos de interesse industrial, farmacêutico, clínico e ambiental, ao lado da cromatografia gasosa (GC) e da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Por ter uma instrumentação relativamente simples, alguns grupos também idealizaram e construíram seus próprios equipamentos [131,133].

Além da simplicidade, pode-se destacar outras vantagens como frequência analítica relativamente alta quando comparada com outras técnicas de separação (ideal para análises rotineiras). Outra característica é a versatilidade, pois uma única coluna capilar pode ser utilizada para a separação de classes de compostos completamente distintas (íons metálicos e compostos orgânicos simultaneamente), sendo necessária apenas a adequação da solução tampão utilizada nas corridas. Pode ser considerada uma técnica verde devido ao baixo consumo de reagentes e amostras, o que implica em menor custo e geração mínima de resíduos. Baixo custo de implementação e manutenção também podem ser considerados.

Entretanto, assim como qualquer técnica, a CE possui algumas limitações, pois não é adequada para a determinação de compostos voláteis e não polares, os quais são melhores determinados por GC. Possui necessidade de se realizar extrações (“cleanup”) em amostras com matrizes mais complexas (fluidos biológicos) e, assim como algumas técnicas, possui dependência dos valores de pH do BGE, o que implica no uso de um tampão. Dependendo do tipo de detecção, a CE apresenta limites de detecção (LOD) relativamente elevados (ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol L⁻¹), o que torna a técnica inviável para análise de traços. O melhoramento dos limites de detecção das técnicas instrumentais compatíveis com CE, assim como a introdução de métodos de pré-concentração ou concentração no próprio capilar constituem, por isso, campos ativos de pesquisa [134].

1.5. Análises rápidas por CE

Atualmente, as ciências das separações, está em busca de métodos analíticos que além de confiáveis possuem uma alta frequência analítica, para que assim possam ser realizadas rotineiramente. Em CE, algumas estratégias para diminuir o tempo de análise incluem a utilização de um instrumento com vários capilares, o qual permite realizar separações de várias amostras simultaneamente [135], ou, a utilização de capilares com comprimento reduzido [136], o que seria alternativamente mais simples e economicamente viável. A utilização de capilares curtos operando sob condições de campos elétricos elevados oferece a base para executar separações ainda mais rápidas por CE permitindo a obtenção de resultados na escala de segundos.

O tempo de migração (t_m) das espécies é definido pela seguinte equação:

$$t_m = \frac{l L}{E (\mu_{ep} + \mu_{eo})} \quad \text{Equação 10}$$

Em que l é o comprimento efetivo do capilar, L é o comprimento total do capilar, E representa a voltagem aplicada na separação e $(\mu_{ep} + \mu_{eo})$ representa a soma das mobilidades

eletroforéticas e eletrosmóticas. Conseqüentemente, ao aumentar o potencial aplicado ou reduzir o comprimento do capilar e seu diâmetro interno, obtêm-se reduções significativas nos tempos de migração das espécies. Nos casos em que se aumenta consideravelmente o potencial aplicado (> 30 kV), a implementação de isolamento elétrico e de sistemas de blindagem é necessária para evitar descargas elétricas, mas esses problemas podem ser evitados, se l e/ou L , forem reduzidos sob condições de tensões moderadas. Outros requisitos são necessários para que se possa trabalhar com capilares reduzidos como, por exemplo, a necessidade de sistemas de introdução confiáveis e que garantam a injeção de estreitas zonas de amostras. Além disso, a composição do tampão usado na separação afeta as mobilidades eletroforéticas e eletrosmóticas e deve ser levada em consideração para a obtenção de separações rápidas [137]. É importante ter em mente que uma análise rápida depende do processo analítico completo, pois, a vantagem das separações rápidas é essencialmente perdida se o protocolo para reabastecimento (injeção da amostra) ou limpeza do capilar for muito demorado.

Na literatura, encontra-se uma gama de trabalhos, relacionados à análise de fármacos e outros analitos e matrizes, com eletroferogramas na escala de segundos, o que desperta o interesse das indústrias farmacêuticas e outras. Na tabela 2 estão listados alguns trabalhos que possibilitaram a análise dos analitos de interesse em menos de 60 segundos.

Tabela 2. Alguns analitos em diferentes matrizes e seus respectivos tempos de análise utilizando CE sob condições rápidas de separação.

Analitos	Tempo (s)	Referência
Codeína e diclofenaco	50	[138]
Ciprofloxacina	30	[139]
Prometazina e codeína	25	[140]
Propranolol	15	[141]
Ácido acetilsalicílico, dipirona, cafeína e produtos de degradação	51	[122]
Escopolamina, orfenadrina, mepiramina, cafeína, dipirona e ácido ascórbico	58	[103]
Diclofenaco e seus contra-íons	40	[121]
Nafazolina e zinco	40	[142]
Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	36	[143]
Arginina, ácido aspártico e ácido glutâmico	5	[144]
Metil, etil, propil e o butilparabeno	60	[145]
Na ⁺ , K ⁺ e Li ⁺	30	[146]
Glifosato e ácido aminometilfosfônico (principal metabólito)	60	[147]
Glicerol livre	28	[148]

1.6. Sistemas de detecção

A diversidade de moléculas que são aplicadas em métodos eletroforéticos e a pequena quantidade de amostra (nL) introduzida no capilar, impulsionaram os estudos para o desenvolvimento de novos sistemas de detecção. Artigos continuam sendo publicados abordando melhorias nos sistemas de detecção conhecidos e introduzindo novos conceitos. A partir de um bom desempenho do sistema de detecção é possível a determinação das espécies de interesse em diferentes condições de análise, obtendo-se uma boa razão sinal-ruído (SNR, do inglês “*signal-noise ratio*”), seletividade, linearidade em larga faixa de concentração, precisão e exatidão,

robustez e baixos limites de detecção (LOD, do inglês “*limit of detection*”) e quantificação (LOQ, do inglês “*limit of quantitation*”) [149].

A escolha do detector depende quase que exclusivamente das propriedades do soluto em questão e da faixa de concentração contemplada. Em geral, os detectores adotados em CE são semelhantes aos usados em HPLC. No entanto, seu acoplamento com o capilar e sua manutenção são mais trabalhosos devido ao baixo volume da cela de detecção e isso faz com que haja a necessidade de sistemas de detecção bastante sensíveis. Os sistemas de detecção usados em CE podem ser classificados em [150]:

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

A tabela 3 apresenta alguns valores típicos de LOD para os sistemas de detecção mais utilizados em CE.

Tabela 3. Limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.

Modalidade de detecção	LOD / mol L⁻¹
Absorção no UV-visível (direta)	$10^{-5} - 10^{-7}$
Amperometria	$10^{-10} - 10^{-11}$
Condutividade	$10^{-6} - 10^{-7}$
Espectrometria de massas	$10^{-8} - 10^{-9}$
Fluorescência direta (lâmpada)	$10^{-7} - 10^{-9}$
Fluorescência direta (laser)	$10^{-9} - 10^{-12}$
UV, fluorescência e amperometria (indireta)	10 a 100 vezes menor que o modo direto

Fonte: [151]

Os detectores também podem ser classificados em específicos (seletivos) ou universais. Os detectores específicos ou seletivos respondem especificamente a certa propriedade do analito. Estes detectores são interessantes em caso de matrizes complexas, no entanto, a seletividade pode impedir de detectar diferentes analitos em uma mesma análise. Os detectores baseados na absorção na região do UV/vis, fluorescência, espalhamento Raman, amperometria e radiometria são exemplos de detectores seletivos. Já os detectores universais não são seletivos e respondem a diferenças entre alguma propriedade do analito em relação ao BGE, ou seja, o sinal adquirido não depende das propriedades específicas dos analitos e sim da diferença entre as propriedades dos analitos e do BGE. Detectores de índice de refração e condutividade são exemplos de detectores universais. Estes detectores permitem que diferentes analitos sejam determinados em uma única análise, o que os torna relativamente atrativos, apesar de apresentarem LOD superiores aos detectores seletivos [108].

Os sistemas de detecção ópticos, como UV-Vis, são os mais utilizados em CE, uma vez que são úteis para um grande número de compostos que contêm grupos cromóforos. Nesse tipo de

detecção, quando um cromóforo passa pela célula de detecção, há uma diminuição da intensidade da luz transmitida ao detector. Pode ser usado em todos os modos de separação possíveis em CE embora exista algumas restrições no BGE em relação às suas propriedades ópticas. É um detector não destrutivo do analito e, portanto, outros detectores podem ser conectados após o detector UV-Vis para obtenção de informações adicionais. Mesmo com o baixo volume de amostras (nL) introduzido no CE, o detector UV-Vis possui alta sensibilidade e, selecionando um comprimento de onda adequado, o sistema poderá ser bastante seletivo para determinados analitos. Outras condições como solvente, temperatura, composição, pH e força iônica do BGE são muito importantes e podem causar alterações no valor de absorvidade e uma mudança no comprimento de onda em que a intensidade de absorção é máxima [152]. Devido às dimensões capilares muito menores em CE quando comparadas às dimensões das colunas de HPLC, a célula do detector deve ter dimensões proporcionalmente menores. Isso limita severamente o comprimento do caminho óptico e, uma vez que a sensibilidade é proporcional ao comprimento do caminho, esta diminui à medida que o diâmetro interno do capilar é reduzido. Contrariamente à HPLC, a detecção UV direta em comprimentos de onda mais baixos (180-200 nm) é geralmente viável em CE [153]. Com capilares de sílica fundida, a detecção abaixo de 200 nm é possível, uma vez que a sílica fundida absorve radiação em aproximadamente 170 nm. Em baixos comprimentos de onda, uma vez que a maioria dos analitos orgânicos tem alguma absorbância, a detecção de moléculas sem grupos cromóforos torna-se possível [152].

A detecção indireta também pode ser feita adicionando-se ao BGE uma substância (cromóforo) que absorve em determinada região do espectro produzindo um sinal de fundo relativamente alto, pois reduz a quantidade de luz que chega até o detector [154]. Quando os analitos, que não absorvem, migram pelo capilar e passam pela zona de detecção, tem-se uma diminuição no sinal e podem ser detectados indiretamente (características universais). Uma alternativa à detecção UV indireta é a introdução de um cromóforo na molécula do soluto através

de derivatização ou complexação seletiva, a fim de tornar possível a detecção UV direta. Além disso, essas estratégias (derivatização ou complexação) também podem ser empregadas para aumentar a intensidade de detecção através da conversão dos analitos em produtos com características de detecção mais favoráveis, no caso, com maior absorvidade molar. Como a detecção ocorre através do capilar, o sistema apresenta o incômodo de aberturas de janelas ópticas nos capilares de sílica por causa do revestimento de poliimida, o que diminui a sua durabilidade. Um detector UV-Vis deve ter a capacidade de assegurar o posicionamento do capilar no feixe de luz de modo a evitar a vibração do capilar sobre aplicação de altas tensões que permitem a máxima relação sinal/ruído, e a capacidade de focar o feixe de luz no diâmetro interno do capilar para evitar a luz dispersa e a resposta não linear do detector. Além disso, as bandas estreitas dos analitos normalmente obtidas em CE exigem uma redução no comprimento axial da janela de detecção para manter altas resoluções. Como uma alternativa a fim de se obter menor LOD, alguns capilares apresentam regiões de detecção com caminho óptico dilatado ou mesmo em “Z” [155]. Uma revisão bibliográfica sobre o uso de detectores UV-Vis em CE está disponível na literatura [152], na qual estão descritos inúmeros métodos com alternativas para aumentar a detectabilidade dos analitos.

Os detectores baseados em fluorescência são largamente utilizados devido à sua alta detectabilidade e simplicidade de operação das análises [156]. A fluorescência induzida por laser (LIF, do inglês “*laser induced fluorescence*”) é a fonte de excitação mais amplamente utilizada por causa da alta intensidade e eficiência do laser em um único ponto. Nesse sistema de detecção, a fonte de luz é acoplada a um microscópio por um cabo de fibra óptica para concentrar a luz em um ponto específico do microcanal, os componentes de uma molécula (fluoróforos) são excitados e depois fluorescem permitindo a detecção e quantificação das espécies químicas de interesse após o processo de separação. Uma vantagem ao aplicar a detecção por fluorescência é que o feixe do laser pode ser focalizado em qualquer parte do canal, de modo que o comprimento eficaz de

separação pode ser variado simplesmente movendo o ponto focal do laser e possibilitando controlar o tempo total da análise. Apesar de apresentarem os menores valores de LOD, os detectores fluorimétricos geralmente necessitam de derivatizações dos componentes da amostra, pois existe um número restrito de espécies que fluorescem, além de ser um detector de valor econômico elevado tanto para aquisição quanto para manutenção. Uma alternativa ao processo de derivatização é a adição de uma substância fluorescente ao BGE, realizando assim uma detecção indireta, elevando nesse caso o LOD. Assim como nos detectores UV-Vis, os sistemas de detecção baseados na fluorescência também possuem o inconveniente da abertura de uma janela no capilar através da retirada do revestimento de poliimida diminuindo a resistência mecânica deste. Recentemente, foi publicado um artigo no qual estão relatadas alternativas para se obter uma maior intensidade da detecção por fluorescência em CE [157].

Os métodos amperométricos de detecção apresentam alta sensibilidade e seletividade. Nesse tipo de detecção, um potencial constante (em relação a um eletrodo de referência) é normalmente aplicado a um microeletrodo de trabalho [149]. Em relação ao posicionamento, os eletrodos de trabalho podem ser colocados na extremidade do capilar (EndC, “end-column detection”) ou utilizando-se uma coluna extra (OffC, “off-column detection”). Na detecção EndC, o eletrodo é posicionado próximo da saída capilar. Alternativamente, o eletrodo de trabalho pode ser parcialmente inserido no orifício de saída. Como os diâmetros internos dos capilares utilizados em CE são, normalmente, da ordem de dezenas de micrômetros, ocorre que em alguns casos os eletrodos de trabalho utilizados podem possuir diâmetro maior, tornando-se necessário o emprego da configuração “wall-jet”. A dificuldade com relação ao posicionamento dos eletrodos no capilar tem como consequência a perda de repetibilidade quando há a necessidade de substituição do capilar [150,158,159]. Um caso particular de detecção EndC é a deposição de filmes metálicos diretamente sobre o capilar, utilizando-se técnicas de “sputtering” (“on-capillary detection”). Deste modo, o eletrodo de trabalho fica imobilizado no capilar, dispensando as etapas de

alinhamento. A detecção amperométrica fica limitada a espécies eletroativas no potencial de trabalho selecionado, embora seja possível operar no modo indireto [150], ou seja, o BGE apresentando eletroatividade. O alto campo elétrico utilizado na separação possui significativa influência nos resultados, uma vez que interfere nas baixas correntes medidas (tipicamente na faixa de 10^{-9} a 10^{-12} A) e assim podem ocorrer reações secundárias no eletrodo, com a prejudicial formação de bolhas. Ainda assim, a detecção amperométrica tem sido uma técnica eletroquímica bastante empregada em CE. Uma revisão bibliográfica sobre detecção eletroquímica aplicada a CE está disponível na literatura e abrange dezenas de trabalhos utilizando a detecção amperométrica [150].

A detecção condutométrica (CD), na sua versão mais simples, envolve a aplicação de um sinal senoidal, da ordem de algumas unidades de kHz, a dois eletrodos de platina. A corrente alternada que flui pelos eletrodos relaciona-se com as dimensões da cela condutométrica e com a condutância da solução entre os eletrodos e, conseqüentemente, com a composição iônica da solução analisada. Como a corrente medida é uma propriedade da solução, nenhuma seletividade é encontrada neste tipo de detecção, o que, de certa forma, é uma vantagem quando aplicada a técnicas de separação. Como uma alternativa a detecção condutométrica convencional surgiu a detecção condutométrica sem contato [150].

1.6.1. Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D)

Geralmente, em CE, a detecção condutométrica em contato com a solução é menos favorável em comparação com outros esquemas de detecção devido a alguns motivos. A maioria dos instrumentos comerciais de CE estão equipados com detectores de absorção UV, pois estes podem ser facilmente adotados a partir de HPLC. Ao usar a detecção por condutividade, o potencial de separação deve ser separado da eletrônica do detector, pois pode complicar o esquema de detecção. O alto potencial de separação usado em CE produz quedas de tensão de até 1000 V/cm ao longo do capilar e, portanto, pode interferir no sinal de detecção por causa do contato direto entre o BGE e o circuito de detecção. Nesse caso, é necessária uma célula de detecção projetada especificamente, que não prejudique a alta eficiência de separação em CE. Além disso, o eletrodo fica sujeito a processos de contaminação devido ao fato do detector entrar em contato com o BGE e com os padrões e amostras que fluem no interior do capilar [160].

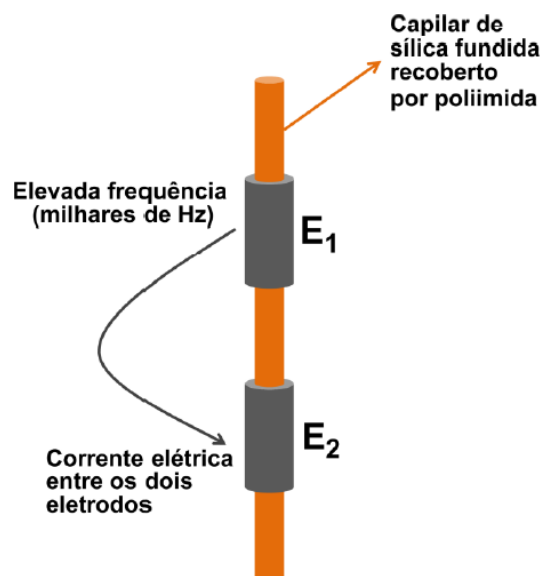
Devido aos problemas presentes nos sistemas de detecção eletroquímica convencionais (amperométrico e condutividade com contato) e ópticos, em 1980, Gaš *et al.* [161] propuseram um sistema de detecção baseado na aplicação de sinais de rádio frequência (RF), no qual o sinal obtido respondia à passagem de espécies iônicas pela coluna capilar. O objetivo era o desenvolvimento de um detector condutométrico sem contato de alta frequência dedicado à isotacoforese, mas seu sistema foi inviabilizado às técnicas capilares pela grande dimensão do arranjo proposto e perda de reprodutibilidade com o desalinhamento dos eletrodos.

Em 1998, Zemann e colaboradores [162] e Fracassi da Silva e do Lago [131] descreveram, mais ou menos na mesma época, mas de forma independente, a detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (C⁴D, do inglês “*capacitively coupled contactless conductometry detection*”). A principal perspectiva desta técnica é que há muito menos limitação em relação ao diâmetro interno do capilar em comparação com as técnicas

isotacoforéticas com detecção condutométrica sem contato apresentadas nos anos 70. Assim, este modo de detecção pode ser usado em capilares com pequenos diâmetros internos e instrumentação miniaturizada, como em sistemas de separação baseados em micro-chips [118]. Neste tipo de detecção, ao contrário da detecção condutométrica convencional (com contato), a instalação dos eletrodos é feita na parte externa do capilar, não necessitando de estratégias como a perfuração do capilar com um laser de CO₂ [163], ou o posicionamento de eletrodos na extremidade do capilar [164,165]. Outra vantagem é que não há a necessidade de remover parte do recobrimento de poliimida do capilar de sílica como detecção UV-Vis (janela de detecção).

Como pode ser observado na Figura 10, a detecção C⁴D baseia-se no acoplamento de dois eletrodos tubulares metálicos colocados ao redor do capilar de sílica fundida a uma certa distância um do outro [131].

Figura 10. Esquema do sistema de detecção C⁴D. E₁ e E₂ são os dois eletrodos do sistema de detecção.



Fonte: Modificada de [166]

De forma simplificada, aplica-se um sinal senoidal de alta frequência, da ordem de milhares de Hertz, em um dos eletrodos que estão posicionados ao redor do capilar. As espécies

iônicas do eletrólito e da amostra permitem a passagem de uma corrente elétrica proporcional à condutividade da solução que flui pelo capilar até o outro eletrodo e, posteriormente, esta corrente gerada é conduzida ao circuito eletrônico. Após o tratamento do sinal analítico (corrente convertida em tensão alternada, com posteriores etapas de retificação e amplificação) o mesmo é conduzido ao dispositivo de registro por meio de uma interface. Existe uma frequência ótima de trabalho, na qual a resistência da solução é relevante e pode ser determinada através da corrente que flui entre os dois eletrodos, pois, dependendo do valor dessa frequência, a resistência da solução no interior do capilar pode ser irrelevante e o detector não registrar as variações na condutância [131,160,167,168]. Geralmente, existem moduladores para que seja possível otimizar a frequência aplicada nos eletrodos, no entanto, na versão do detector utilizado 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 Vpp, não sendo possível realizar seu ajuste fino. Essa frequência e amplitude de sinal são compatíveis com a maioria dos eletrólitos usados em CE, dispensando assim as demoradas adequações necessárias para o bom funcionamento dos detectores comerciais.

A resposta do detector é devida a substituição do co-íon presente no BGE pelo íon a ser analisado. Nos casos em que o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do BGE ocorre um aumento da condutividade nessa região, o qual é registrado como um pico positivo no eletroferograma. Inversamente, se o co-íon apresenta maior mobilidade que o analito, o pico é registrado como sinal negativo. Quanto maior for a diferença de mobilidade do BGE em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector, por isso o BGE possui papel fundamental no sistema CE-C⁴D [121].

Dentre as vantagens deste tipo de detecção pode-se destacar a facilidade de posicionar os eletrodos, o desacoplamento entre o circuito de detecção e potencial de separação tendo uma diminuição considerável da interferência do campo elétrico usado na separação das espécies o que

favorece a relação sinal/ruído (SNR). O detector C^4D raramente requer etapas prévias de derivatização, devido ao posicionamento externo dos eletrodos não tem a possibilidade de contaminação, obtendo-se, conseqüentemente, maior estabilidade e flexibilidade para a escolha do BGE. Além disso, é um sistema robusto, de baixo custo e mínima demanda por manutenção. Com isso, a C^4D vem ganhando espaço rapidamente como forma de detecção em sistemas de CE [131].

Mais detalhes sobre os aspectos fundamentais da CE- C^4D podem ser encontrados em um artigo de revisão publicado recentemente por Kuba'n e Hauser [169], além das referências já citadas anteriormente neste tópico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de métodos simples, rápidos, com baixo custo e baixo consumo de amostras e reagentes para determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas utilizando a CE-C⁴D.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Otimização de metodologias, utilizando CE-C⁴D, para análise de fármacos em diferentes amostras farmacêuticas;
- ✓ Determinação rápida e simultânea de:
 - Amoxicilina, clavulanato e potássio;
 - Hidroclorotiazida, losartana e potássio;
 - Hidroclorotiazida e atenolol;
 - Hidroclorotiazida e metoprolol;
 - Hidroclorotiazida e propranolol;
 - Hidroclorotiazida e valsartana;
 - Hidroclorotiazida e benazepril;
 - Hidroclorotiazida e captopril;
 - Hidroclorotiazida e enalapril;
 - Hidroclorotiazida e lisinopril;
 - Hidroclorotiazida e ramipril.
- ✓ Comparação estatística dos resultados obtidos pelo método proposto e outros métodos (HPLC e fotometria de chama);
- ✓ Estudo da degradação do CLA.

3. Parte experimental

3.1. Reagentes e amostras

Todos os reagentes usados foram de grau analítico (pureza $\geq 98\%$). A água deionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) foi obtida a partir de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). Na tabela 4 estão listados todos os reagentes e as respectivas empresas dos quais foram adquiridos.

Tabela 4. Relação de reagentes usados no trabalho e empresas onde foram adquiridos.

Reagentes	Empresas
Ácido Bórico	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Amoxicilina	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Atenolol	Attivos Magistrais (São Paulo, SP, Brasil)
Benazepril	Copermed (Pouso Alegre, MG, Brasil)
Captopril	Attivos Magistrais (São Paulo, SP, Brazil)
CHES	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Clavulanato de potássio	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
CTAB	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Enalapril	Infinity Pharma (São Paulo, SP, Brasil)
Hidroclorotiazida	Attivos Magistrais (São Paulo, SP, Brasil)
Hidróxido de sódio (NaOH)	Panreac (Castellar del Vallès, Spain)
Histidina	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Lisinopril	Infinity Pharma (São Paulo, SP, Brasil)
Losartana	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Metanol	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Metoprolol	Infinity Pharma (São Paulo, SP, Brasil)
Propranolol	Attivos Magistrais (São Paulo, SP, Brasil)

Ramipril	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
TRIS	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
TAPS	Sigma-Aldrich (St. Louis, United States)
Valsartana	Infinity Pharma (São Paulo, SP, Brasil)

Formulações farmacêuticas contendo AMX e KCLA ou HCT na presença dos princípios ativos estudados foram obtidas em farmácias locais. Dez comprimidos de cada amostra foram pesados com precisão e depois macerados a um pó fino e homogêneo. Nas análises de amostras contendo AMX e KCLA, as soluções estoques e amostras foram preparadas em meio de 2 mmol L^{-1} de NaOH. Pois os princípios ativos são pouco solúveis em meio aquoso e solúveis em meio básico. Já nas análises das amostras contendo HCT e os demais princípios ativos, todas as soluções estoque e amostras foram preparadas usando metanol como solvente. Todas as soluções de amostras e padrões foram mantidos sob ultra-som (Ultracleaner 1400A UNIQUE) durante 10 min para completa solubilização. Antes da injeção no sistema de CE- C^4D , as amostras foram filtradas em membranas com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e diluídas adequadamente em água deionizada até uma concentração situada na faixa linear da respectiva curva de calibração.

3.2. Instrumentação

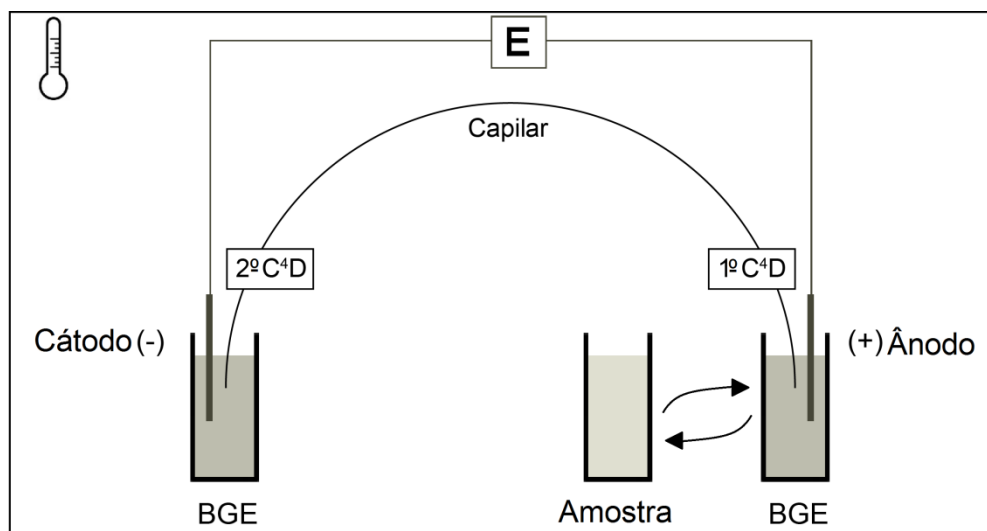
Os eletroferogramas foram obtidos utilizando um equipamento de CE- C^4D construído no laboratório do Prof. Claudimir Lúcio do Lago, no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP/SP. O equipamento possui dois detectores condutométricos sem contato compactos acoplados capacitivamente (CE- C^4D) [131,132]. Uma imagem do equipamento de CE utilizado (A) e um esquema do sistema (B) estão mostrados na Figura 11.

Figura 11. Imagem do equipamento (A) usado no laboratório e esquema do sistema CE-C⁴D (B).

(A)



(B)



Esta versão de C⁴D não possui partes móveis, como potenciômetros e conectores, sendo assim considerado um detector compacto e robusto. Um oscilador trabalhando na frequência fixa 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 V_{pp} [132]. Um programa de computador desenvolvido em ambiente LabView 8 (National Instruments, Austin, TX) é responsável pelo controle do equipamento e aquisição dos dados. O instrumento é equipado com uma fonte de alta tensão bipolar (Spellman Power Supply 30kV).

Os detectores estão posicionados ao longo do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida tinha 50 μm de diâmetro interno, 375 μm de diâmetro externo, 40 cm de

comprimento total nos experimentos para determinação de AMX e KCLA e 50 cm de comprimento total nos demais experimentos (Agilent, Folsom, CA, EUA). Desta forma, no primeiro detector, o comprimento efetivo do capilar era de 10 cm e no segundo de 30 cm (AMX e KCLA) ou 40 cm (HCT na presença de outros). Antes das análises, o capilar foi pré-condicionado por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos, em seguida com água deionizada durante 10 minutos e, finalmente, com o BGE a ser utilizado nos experimentos durante 10 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (com pressão constante de 25 kPa) no lado direito do equipamento (ânodo). Foi utilizada uma diferença de potencial de +25 kV (lado da injeção) na determinação de AMX e KLOS e um potencial de +20 kV na determinação dos demais analitos.

Nas análises por HPLC para a determinação de AMX e CLA foi utilizado um equipamento Shimadzu LC-10 VP com um detector UV-Vis (SPD-10AV), uma coluna LC (Lichrospher 100 A RP18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm), um desgaseificador (DGU-20A5), um injetor manual (20 µL) e uma bomba (LC-10AD-VP). A fase móvel era composta de metanol/água (15:85, v/v; pH ajustado para 6,0 com ácido fosfórico). O comprimento de onda usado foi de 235 nm e a vazão foi de 1,0 mL min⁻¹. Estas condições foram adaptadas de um trabalho publicado anteriormente [14].

Nas análises por HPLC para a determinação de LOS e HCT foi utilizado um equipamento Shimadzu LC-10 VP com um detector UV-Vis (SPD-10AV), uma coluna (Macherey-Nagel C18, 10 cm, 5 µm), um desgaseificador (DGU-20A5), um injetor manual (20 µL) e uma bomba (LC-10AD-VP). A fase móvel foi composta de acetonitrila/tampão fosfato (35:65, v/v; pH 4,0; 0,1 mol L⁻¹). O comprimento de onda usado foi de 230 nm e a vazão foi de 1,0 mL min⁻¹. Estas condições foram adaptadas de um trabalho publicado anteriormente [30].

A determinação de K foi realizada por fotometria de chama utilizando um equipamento 910M (Analyzer Instrumentação Analítica, São Paulo, Brasil) localizado no laboratório de graduação do IQUFU.

As medidas de pH das soluções foram feitas em um pHmetro de bancada (PHS3BW - BEL engineering), o qual foi calibrado diariamente para maior confiabilidade dos resultados.

3.3. Método para determinação de K, CLA e AMX por CE-C⁴D

3.3.1. Estudo do BGE

Inicialmente, três composições de BGE com diferentes valores de força iônica e capacidades tamponantes foram testadas, buscando o melhor desempenho, sendo eles:

- BGE 1: 10 mmol L⁻¹ de TRIS (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) + 10 mmol L⁻¹ de TAPS (ácido 3-(tris(hidroximetil)metilamino)propano-1-sulfônico) (pH = 8,0) ;
- BGE 2: 10 mmol L⁻¹ TRIS + 10 mmol L⁻¹ de TAPS + 0,2 mmol L⁻¹ CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) (pH 8,4);
- BGE 3: 30 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH ajustado em 8,0 com a adição de NaOH.

Posteriormente à escolha do BGE, foram realizados estudos de otimização como:

- Tempo de injeção (0,3 – 2,0s);
- Potencial de separação (15 – 25kV).

3.3.2. Estudo da degradação do CLA

Os testes de degradação do CLA foram feitos de três formas: (i) uma solução aquosa contendo 1 mmol L⁻¹ de KCLA foi exposta à luz solar por 24h; (ii) uma solução padrão contendo 1,0 mmol L⁻¹ de KCLA dissolvido em H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ durante 24 h; (iii) uma solução padrão contendo 1,0 mmol L⁻¹ KCLA dissolvido em NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 24 h. As três soluções

foram injetadas no sistema CE-C⁴D após 24h e, em seguida, todas as amostras foram então dopadas com 1,0 mmol L⁻¹ de KCLA e os eletroferogramas obtidos foram analisados.

3.4. Método para determinação de HCT na presença de outros por CE-C⁴D

Assim como na determinação de KCLA e AMX, o primeiro estudo realizado para a determinação simultânea de HCT na presença de outros princípios ativos foi a escolha do BGE, no qual foram avaliadas 3 composições de BGE com diferentes valores de força iônica e capacidades tamponantes, sendo eles:

- BGE 1: 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH ajustado em 9,0 com a adição de NaOH;
- BGE 2: 10 mmol L⁻¹ de CHES (ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico) com pH ajustado em 9,0 com a adição NaOH;
- BGE 3: 10 mmol L⁻¹ de HIS (histidina) com pH ajustado em 9,0 com a adição NaOH.

Após o estudo do BGE, experimentos foram realizados a fim de otimizar as condições a serem usadas, como:

- pH do BGE (8,7 – 9,5);
- Concentração do BGE (5 – 50 mmol L⁻¹);
- Tempo de injeção (0,5 – 2,0s);
- Potencial de separação (15 – 25kV).

3.5. Validação dos parâmetros analíticos dos métodos propostos

3.5.1. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [170], o LOD pode ser definido como a concentração ou quantidade derivada da menor medida que pode ser detectada com uma certeza apropriada por um determinado método 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. Geralmente este fator numérico é de 3 para LOD e de 10 para LOQ. Em outras palavras, o LOD seria a quantidade mínima, em concentração, de um analito que produza um sinal analítico de três vezes o desvio padrão do branco na região do tempo de migração do analito.

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:

$$LOD = 3 \frac{SB}{b} \quad \text{Equação 11}$$

onde, *SB*: desvio padrão das 10 medidas do branco; *b*: 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 ruído. Para as medidas em CE-C⁴D, os valores calculados por este método superestimam o LOD [171]. Assim, neste trabalho, foi utilizada uma outra abordagem para se determinar o LOD. Os LODs foram obtidos de forma experimental, a qual consiste em analisar soluções de concentração cada vez mais diluídas até que o sinal do analito seja cerca de três vezes a média do nível do ruído [172,173]. A vantagem dessa abordagem é a existência de 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 ruído e dizer se há ou não presença do analito.

3.5.2. Linearidade

O estudo da faixa linear de trabalho para os analitos alvo foi realizado com intuito de se obter um coeficiente de correlação adequado ($\geq 0,99$) segundo a ANVISA [174], de modo a ser

aplicável à análise de amostras reais de fármacos em uma única corrida. 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) e a faixa de concentração dos fármacos nas amostras.

Uma grande vantagem do uso da detecção C⁴D é a de se ter uma resposta linear entre condutividade e uma faixa de concentração relativamente ampla, desta forma é possível se trabalhar, principalmente em valores mais elevados de concentração, o que não é comum em outras técnicas.

3.5.3. Precisão

Os estudos de repetibilidade analisam se o método apresenta uma boa precisão a partir dos desvios padrões relativos (RSD), que são calculados a partir da seguinte equação:

$$\text{RSD} = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

onde, s : desvio padrão absoluto; \bar{X} : média dos sinais analíticos.

A repetibilidade de injeção intra-dia foi feito a partir de 10 injeções sucessivas no mesmo dia, mesmo equipamento e o mesmo analista. A precisão intermediária (inter-dias) foi feito a partir de 3 injeções em dias distintos com o mesmo equipamento e o mesmo analista.

3.5.4. Exatidão (ensaios de recuperação)

As recuperações dos fármacos foram calculadas utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{|C_{final} - C_{amostra}|}{C_{adicionada}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

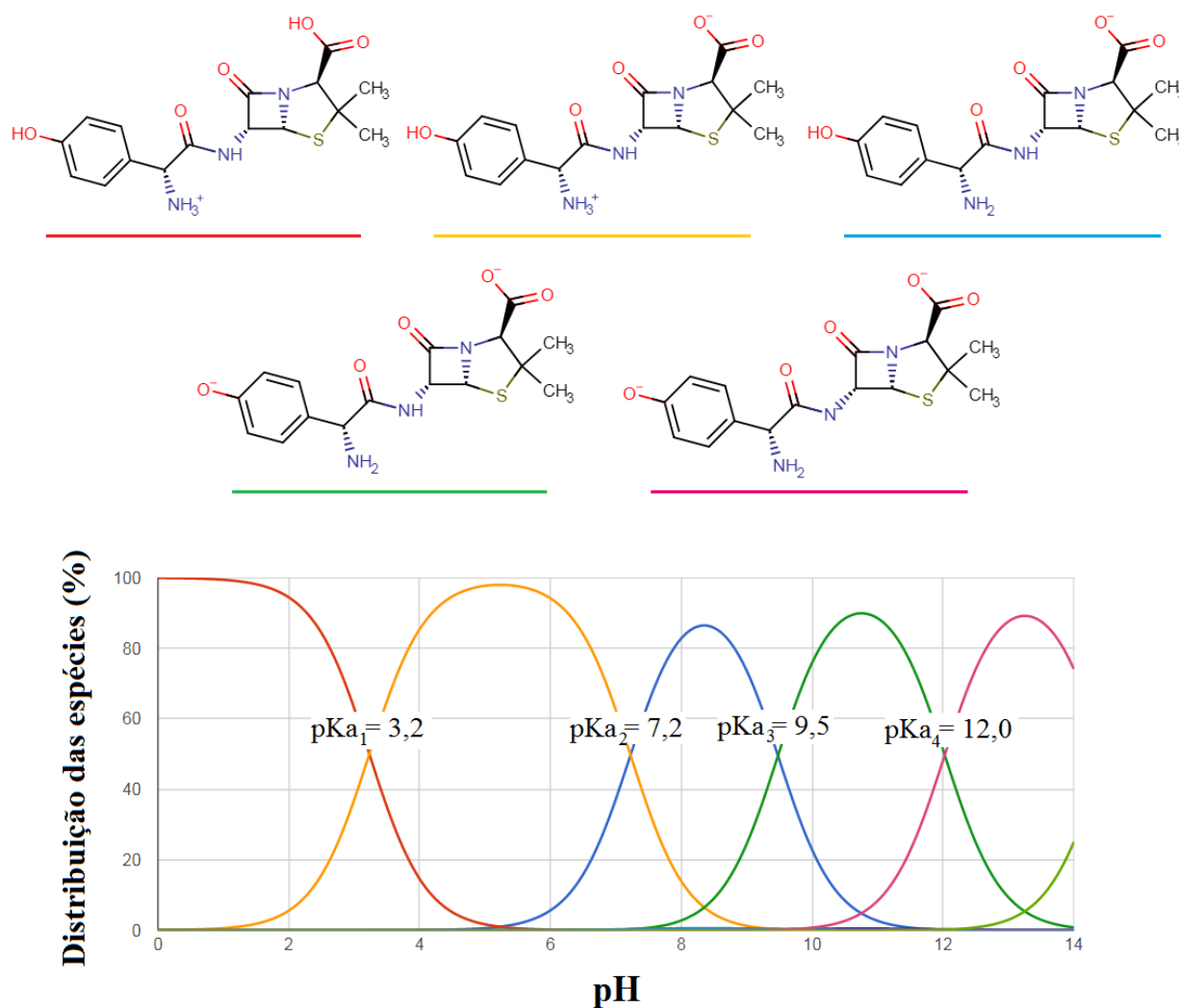
onde, C_{final} : Concentração do fármaco analisada na amostra após a adição; $C_{amostra}$: Concentração original do fármaco na amostra; $C_{adicionada}$: Concentração adicionada de fármaco.

4. Resultados e discussões

4.1. Determinação simultânea de AMX e KCLA

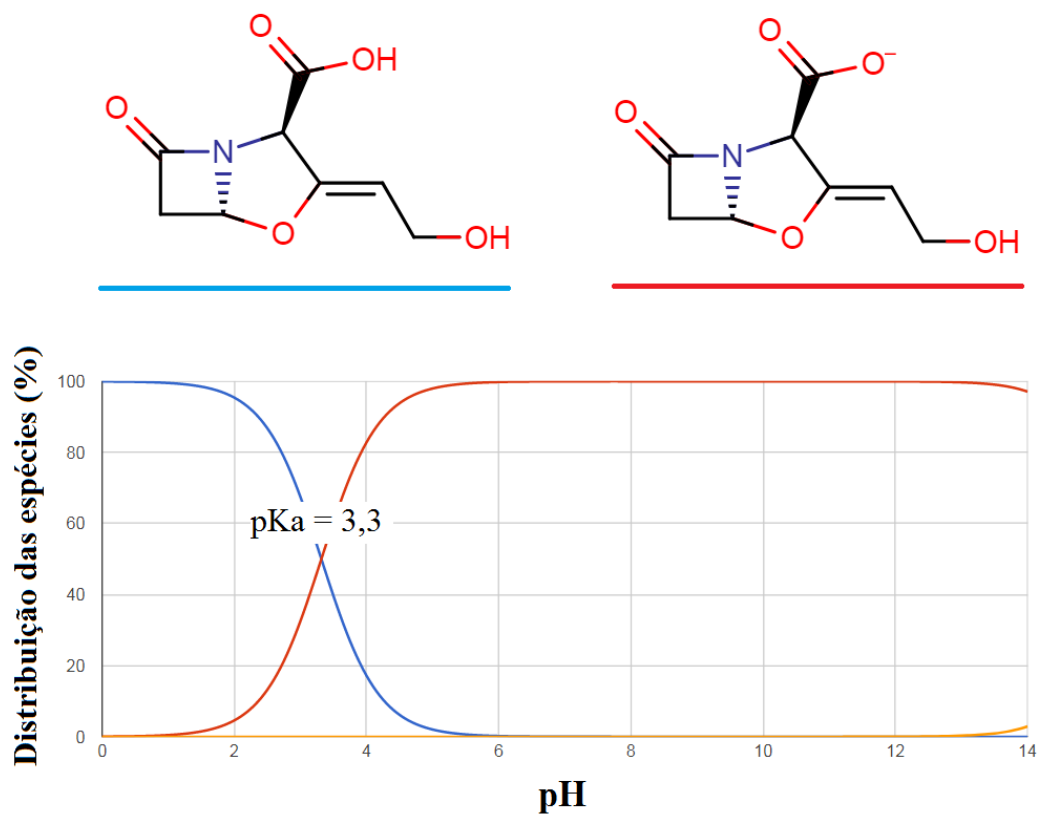
As Figuras 12 e 13 mostram os valores de pKa e as distribuições das espécies em função do pH das moléculas de AMX e CLA, respectivamente.

Figura 12. Distribuição das espécies vs pH para AMX.



Fonte: Modificada de [7]

Figura 13. Distribuição das espécies vs pH para CLA.



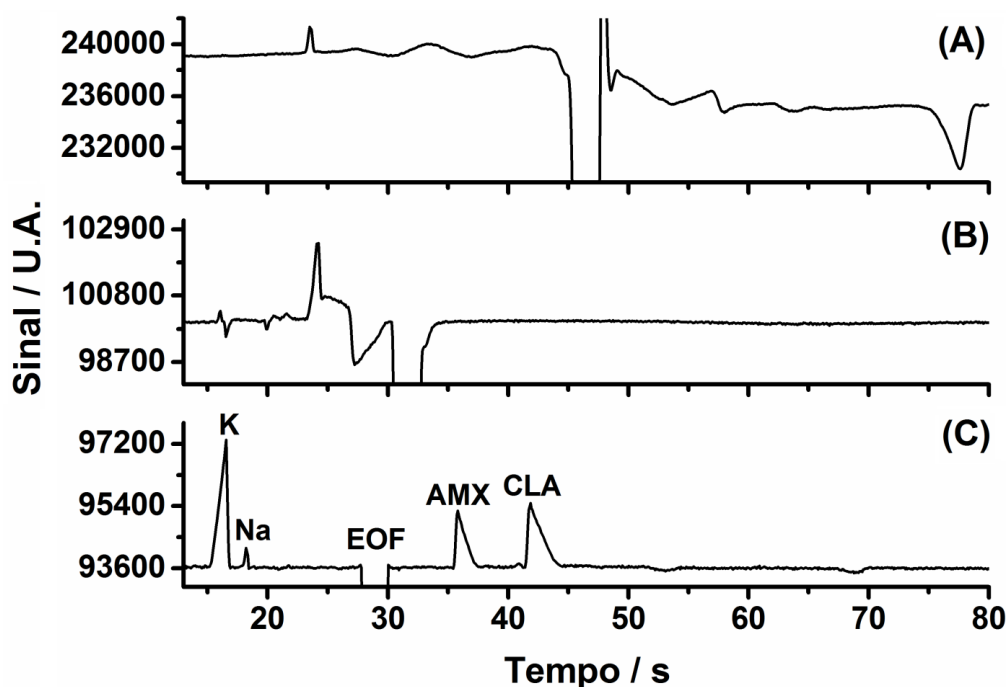
Fonte: Modificada de [7]

Como pode ser observado, a AMX possui uma complexa distribuição de espécies em função do pH da solução sendo encontrada nas formas catiônicas, aniônicas ou zwitteriônicas devido ao seu comportamento anfotérico ($pI = 5,4$). As formas catiônicas e aniônicas de AMX são predominantes em soluções com pH abaixo e acima de 5,4, respectivamente. CLA apresenta uma distribuição de espécies mais simples e sua forma aniônica é predominante acima de pH 2,7. Em soluções com $pH > 5$, 100 % das moléculas de CLA estarão em sua forma aniônica. Baseado nestas observações, conclui-se que ambas as espécies podem ser separadas por CZE.

A estratégia adotada para a separação rápida de AMX e CLA por CZE foi o uso de BGEs com valores de pH acima de 7, pois nesta condição ambos os compostos estão na forma aniônica. Três diferentes soluções foram avaliadas como BGE: (A) 30 mmol L⁻¹ de ácido bórico (pH = 8,0;

ajustado com NaOH); (B) 10 mmol L⁻¹ TRIS/TAPS + 0,2 mmol L⁻¹ CTAB (pH = 8,4); e (C) 10 mmol L⁻¹ TRIS/TAPS (pH = 8,4). A Figura 14 mostra os eletroferogramas obtidos nessas condições. Um pico correspondente ao sódio foi detectado porque as amostras e as soluções padrões foram inicialmente diluídas em 2 mmol L⁻¹ de NaOH.

Figura 14. Eletroferogramas obtidos no estudo do efeito da composição do BGE na separação de K, AMX e CLA. Concentrações dos analitos: 185 μmol L⁻¹ de KCLA e 500 μmol L⁻¹ de AMX. BGEs: (A) 30 mmol L⁻¹ ácido bórico (pH 8,0; ajustado com NaOH); (B) 10 mmol L⁻¹ TRIS/TAPS + 0,2 mmol L⁻¹ CTAB (pH 8,4); (C) 10 mmol L⁻¹ TRIS/TAPS (pH 8,4). Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; capilar de sílica fundida d.i.: 50 μm; Comprimento total do capilar: 40 cm; Comprimento efetivo: 10 cm; U.A.: unidade arbitrária.

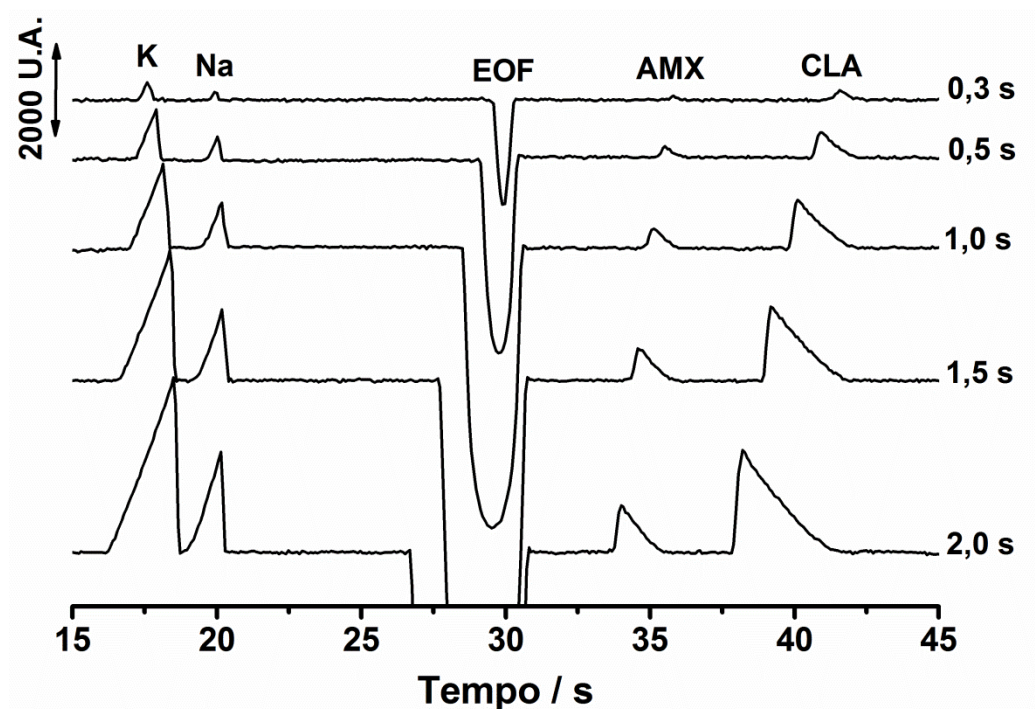


Inicialmente, para reduzir o tempo de análise das espécies aniônicas (AMX e CLA) por CZE, o EOF foi invertido pela adição de um tensoativo catiônico (CTAB) [130,175] no BGE e, conseqüentemente, os ânions foram analisados em modo de separação co-EOF (análise mais rápida). No entanto, quando o surfactante catiônico (CTAB) foi adicionado ao BGE (Figura 14B), um eletroferograma instável e com resolução ruim foi obtido, provavelmente devido à interação

entre os analitos e as micelas do CTAB. Portanto, o tensoativo catiônico foi removido do BGE e o modo de separação contra-EOF foi então avaliado. Nesta condição, os cátions migram na direção do detector em modo co-EOF (EOF + mobilidade eletroforética) e ânions com baixa mobilidade em modo contra-EOF (mobilidade EOF > mobilidade eletroforética) e são então detectados imediatamente após o marcador EOF (sinal gerado pelas moléculas neutras no C⁴D). Entre os BGEs avaliados (TRIS/TAPS e tampão borato), o BGE composto por 10 mmol L⁻¹ TRIS/TAPS (Figura 14C) apresentou três características desejáveis: (1) mobilidade elevada do EOF, que foi capaz de mover ambos ânions AMX e CLA em direção ao detector (modo contra-EOF) em menos de 1 minuto; (2) mobilidade/condutividade muito menor do que os analitos, o que gerou picos positivos intensos para ambos os ânions; e (3) uma linha base estável e com baixo ruído. Além disso, o contra-íon do sal de CLA (K) pôde ser analisado e a determinação estequiométrica do sal também foi possível. O terceiro BGE avaliado (tampão de borato) não forneceu resultados satisfatórios (Figura 14A).

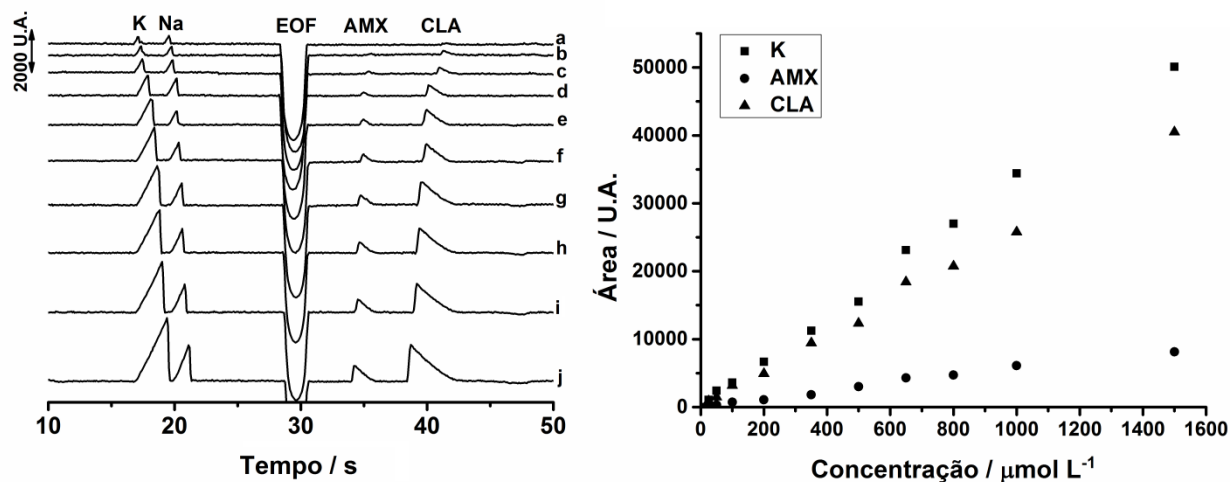
No próximo estudo, a influência do potencial de separação (+ 15 a + 25 kV) e tempo de injeção hidrodinâmica (de 0,3 a 2,0 s a 25 kPa) na separação dos analitos foram avaliados. Os eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção estão mostrados na Figura 15. Com o aumento do tempo de injeção, tem-se um aumento na detectabilidade dos analitos, uma vez que uma maior quantidade de amostra é injetada no sistema CE-C⁴D. No entanto, simultaneamente ao aumento do sinal do analito, tem-se também a diminuição na resolução devido ao alargamento dos picos. Assim, o melhor desempenho foi obtido utilizando + 25 kV e 1 s (25 kPa) como potencial de separação e tempo de injeção, respectivamente.

Figura 15. Eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção utilizando uma solução padrão contendo AMX e KCLA ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 10 mmol L^{-1} TRIS/TAPS (pH 8,4). Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; capilar de sílica fundida d.i.: $50 \mu\text{m}$; Comprimento total do capilar: 40 cm ; Comprimento efetivo: 10 cm ; U.A.: unidade arbitrária.



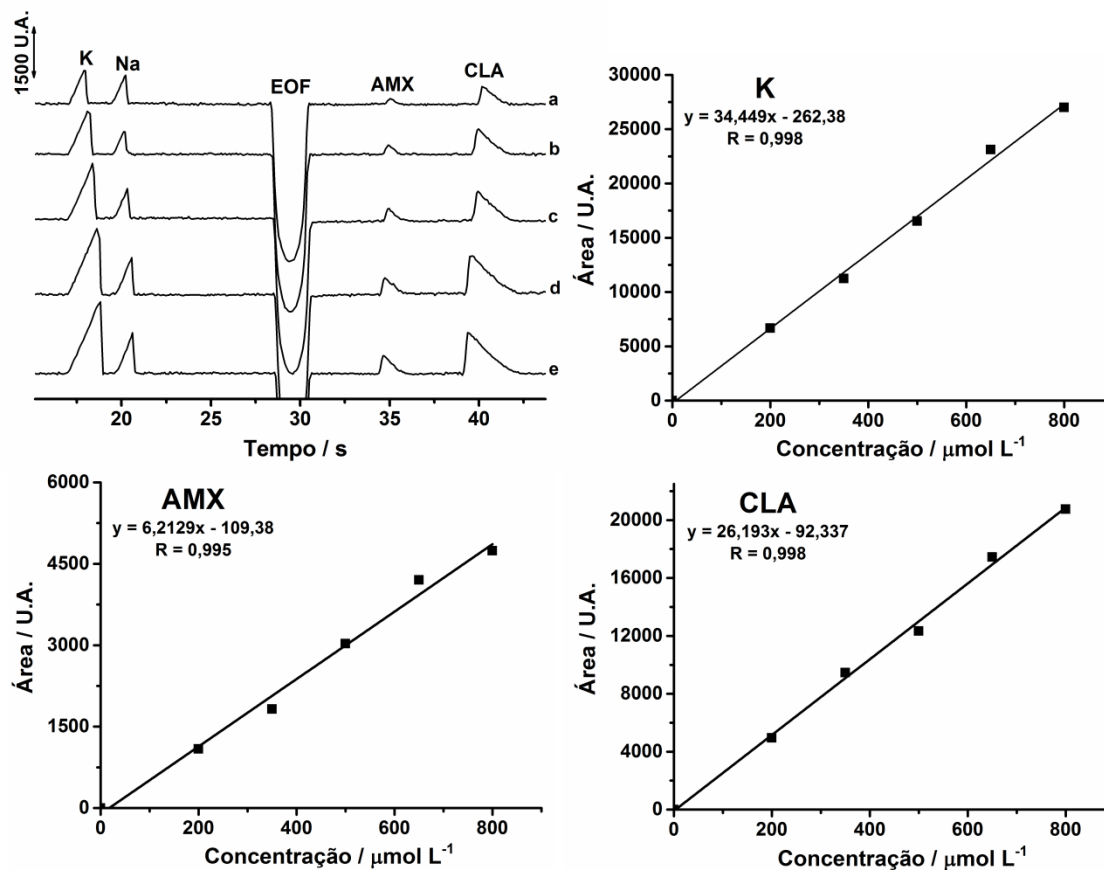
No estudo seguinte, a faixa linear de resposta (condutividade versus concentração) dos analitos em estudo foi avaliada (Figura 16). Como pode ser observado, as áreas dos picos apresentaram relações lineares em função das concentrações de K, AMX e CLA no intervalo de concentração entre $25\text{-}1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ com coeficientes de correlação linear melhores ou iguais a $0,995$ ($n = 3$). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a $0,99$ [174]. É importante ressaltar que uma das vantagens do sistema CE- C^4D é a obtenção de uma ampla faixa linear de resposta [176] e que, nesse caso, o estudo da faixa linear, o qual permite conhecer o limite de linearidade, foi limitado pela resolução entre K e Na.

Figura 16. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KCLA e AMX e suas respectivas relações de sinal versus concentração. Concentrações crescentes dos analitos: (a – j: 25 – 1500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de KCLA e AMX. Demais condições, ver Figura 15.



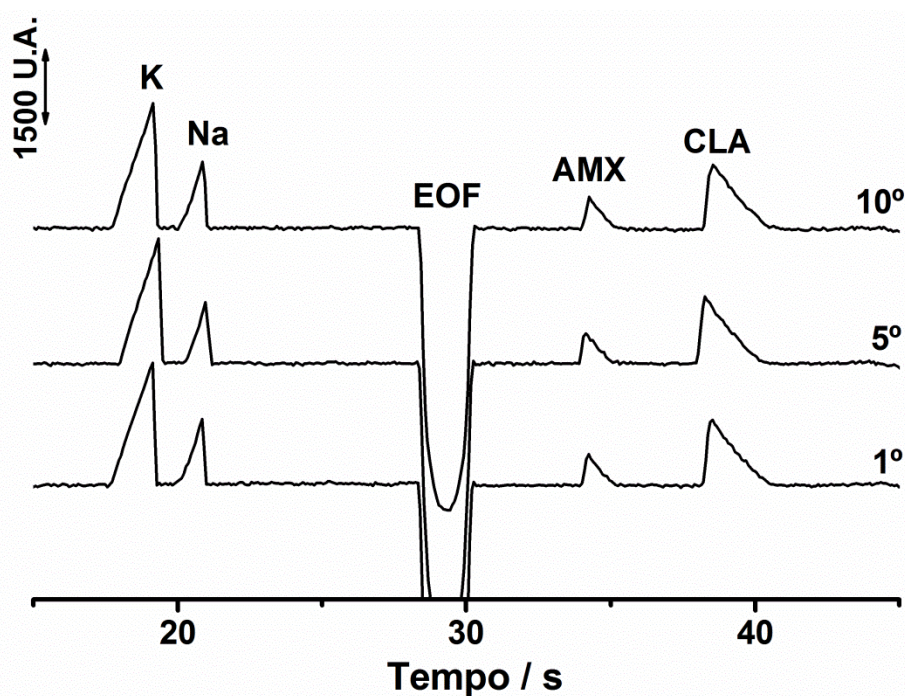
Posteriormente, uma menor faixa de concentração, denominada faixa de aplicação, foi adotada para construção das curvas de calibração (Figura 17). A ANVISA determina um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos.

Figura 17. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KCLA e AMX (a – e: 200 – 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as suas respectivas curvas de calibração ($n=3$). Demais condições, ver figura 15.



A repetibilidade de injeção (intra-dia) do método proposto foi avaliada por dez injeções sucessivas de uma solução padrão contendo 650 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMX e KCLA. Três eletroferogramas deste estudo são mostrados na Figura 18 (1^o, 5^o e 10^o eletroferogramas).

Figura 18. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com injeções sucessivas ($n = 10$) de uma solução padrão contendo KCLA e AMX. Concentração dos analitos: $650 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KCLA e AMX. Demais condições, ver Figura 15.



Os RSDs obtidos a partir das áreas dos picos da Figura 18 foram 4,5, 2,0 e 2,5% para AMX, CLA e K, respectivamente. A precisão intermediária (inter-dia) também foi avaliada através da análise de uma solução padrão ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMX e KCLA) em três dias diferentes. Neste estudo, os RSDs das áreas dos picos foram de 7,3, 4,3 e 6,6% para AMX, CLA e K, respectivamente. Esses resultados mostram que o método possui boa estabilidade mesmo em dias distintos. Ainda assim, a calibração diária seria mais indicada quando houver a necessidade de uma maior precisão dos resultados.

Um resumo das características analíticas do método proposto é apresentado na Tabela 5.

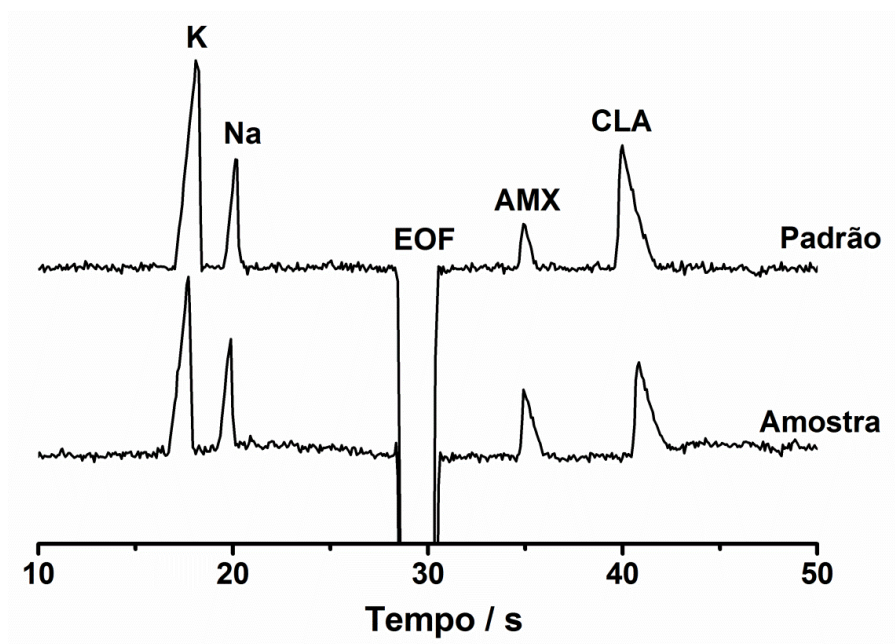
Tabela 5. Características analíticas do método proposto.

	AMX	CLA	K
Intervalo de trabalho ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	200 – 800	200 – 800	200 – 800
Coefficiente de correlação	0,995	0,998	0,998
Tempo de migração (s)	$35,1 \pm 0,1$	$42,3 \pm 0,2$	$18,7 \pm 0,2$
RSD intra-dia (%; n = 10)	4,5	2,0	2,5
RSD inter-dia (%; n = 3)	7,3	4,3	6,6
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$; S/N = 3)	25	5	4
LOD (mg L^{-1} ; S/N = 3)	9,1	1,0	0,2
Injeções por hora	75	75	75
Resolução*	$3,39 \pm 0,18$	$2,86 \pm 0,10$	$1,84 \pm 0,10$

*Calculado entre o pico do analito (AMX e CLA) e o pico anterior ou entre o pico do analito (K) e o pico posterior.

A Figura 19 mostra os eletroferogramas obtidos para soluções padrão e amostra de formulação comercial contendo AMX e KCLA.

Figura 19. Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão e amostra de KCLA e AMX. Concentração dos analitos: $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KCLA e AMX. Demais condições, ver Figura 15.



Ambos os eletroferogramas (soluções padrão e amostra) mostram padrões similares e que uma separação completa de analitos foi possível, usando o primeiro detector (10 cm de comprimento efetivo do capilar). O eletroferograma obtido para a solução amostra não apresentou picos desconhecidos ou adicionais e conseguiu-se uma separação satisfatória dos analitos em cerca de 45 s, o que fornece uma frequência de injeção de 75 injeções por hora. O tempo gasto entre uma análise e outra (tempo de injeção e troca de soluções) é menor que 5 s.

A exatidão do método CE-C⁴D foi estimada por estudos de recuperação. Amostras de formulações farmacêuticas foram analisadas antes e após a adição de concentrações conhecidas dos três analitos (AMX, CLA e K) dentro do intervalo linear.

As recuperações alcançadas foram de 98 a 103%, indicando a ausência de efeitos de matriz entre as soluções amostra e padrão. Além disso, a exatidão do método proposto também foi avaliada pela determinação de AMX, CLA e K em amostras farmacêuticas e comparação dos resultados aos obtidos por HPLC (AMX e CLA) e fotometria de chama (K). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Determinação de AMX, CLA e K em formulações farmacêuticas por CE-C⁴D, HPLC-UV e fotometria de chama (FP) (valor \pm SD; n = 3).

Amostra		Bula (mg/tablete)	HPLC (mg/tablete)	FP (mg/tablete)	CE-C ⁴ D (mg/tablete)	$t_{\text{calculado}}$
A1	K	20,5	-	20,3 \pm 1,5	20,5 \pm 0,7	-
A2	K	20,5	-	20,2 \pm 1,7	19,8 \pm 0,8	1,03
A1	AMX	500	462 \pm 14	-	462 \pm 23	-
A2	AMX	500	476 \pm 10	-	466 \pm 19	1,40
A1	CLA	105	103 \pm 2	-	103 \pm 3	-
A2	CLA	105	107 \pm 4	-	100 \pm 4	1,40

Os resultados obtidos por CE-C⁴D foram comparados estatisticamente com os obtidos por HPLC (AMX e CLA) e fotometria de chama (K) usando o teste-*t* de Student pareado. Os

valores de t calculados foram menores do que o valor tabelado (4,303; $n = 3$), o que indica que não houveram diferenças significativas entre os resultados (nível de confiança de 95%).

O método proposto usando CE-C⁴D é pelo menos 2,7 vezes mais rápido do que o método eletroforético relatado anteriormente [18] e até 40 vezes mais rápido do que os métodos por HPLC para determinação de CLA e AMX [11,12,14,16,17,19], atingindo uma frequência analítica de 75 injeções h⁻¹. Além disso, a possibilidade de determinação simultânea de K e CLA (determinação estequiométrica do sal de KCLA em uma única corrida) é um destaque do método proposto em comparação com trabalhos publicados anteriormente.

4.1.1. Estudo da degradação do CLA

Uma das utilidades da determinação simultânea de K e CLA pode ser observada na Figura 20. Tanto o K quanto o CLA apresentaram picos similares (Tabela 7) nos eletroferogramas obtidos antes e após o teste de fotoestabilidade. Como K é uma espécie iônica estável, é possível concluir sem experimentos adicionais que CLA também apresentou um comportamento estável no período estudado (24 h). O resultado obtido aqui está de acordo com um estudo anterior [177] em que a estabilidade do CLA foi avaliada em meio aquoso e a degradação só foi observada após 72 h.

Figura 20. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo 1 mmol L^{-1} de KCLA antes (A) e depois (B) da exposição à luz solar por 24 h. Demais condições, ver figura 15.

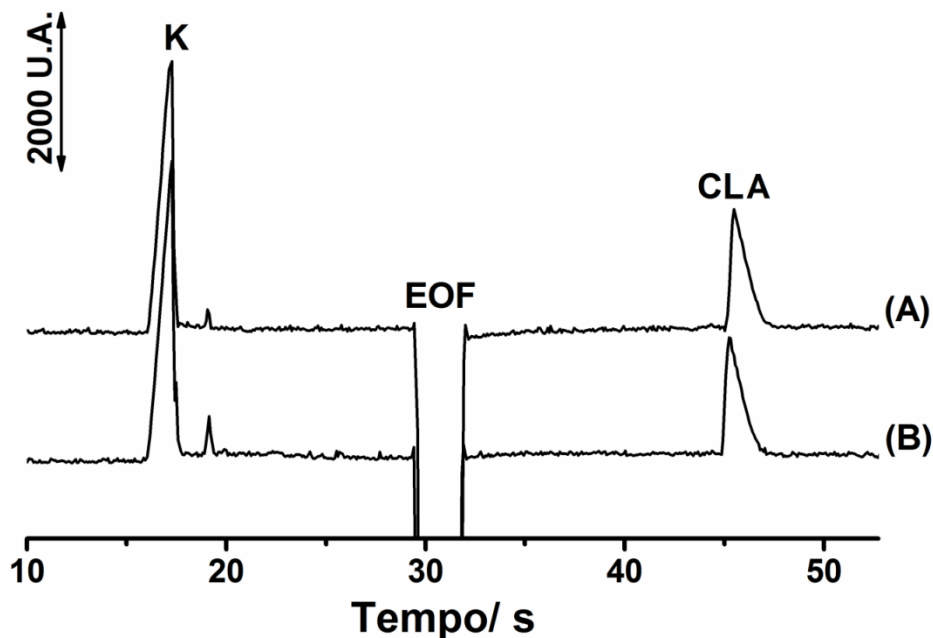
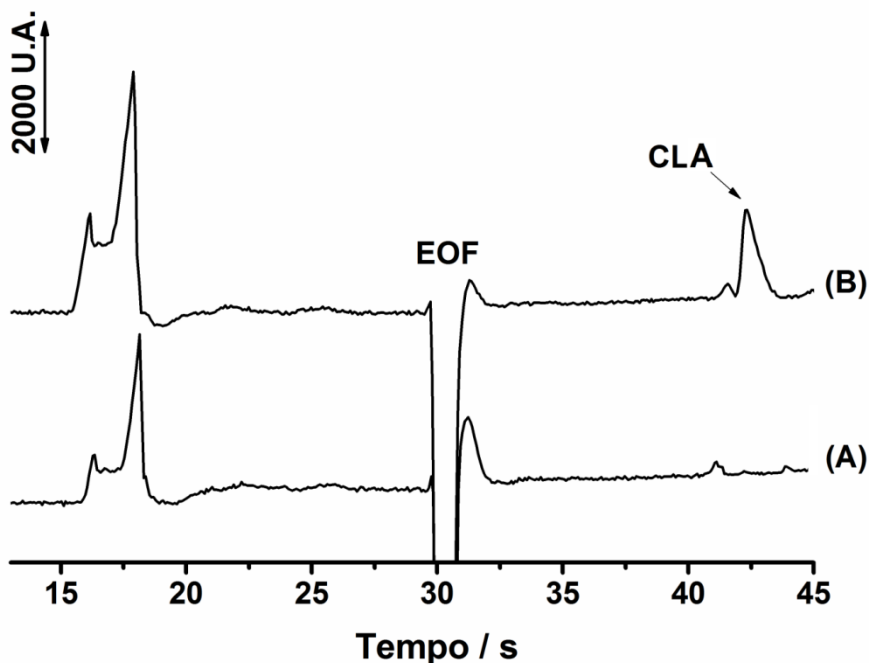


Tabela 7. Valores obtidos para as áreas dos picos de K e CLA antes e após a exposição à luz solar.

	Área do pico (U.A.)	
	K	CLA
Antes da exposição à luz solar	38,9	21,8
Após a exposição à luz solar	39,5	21,7

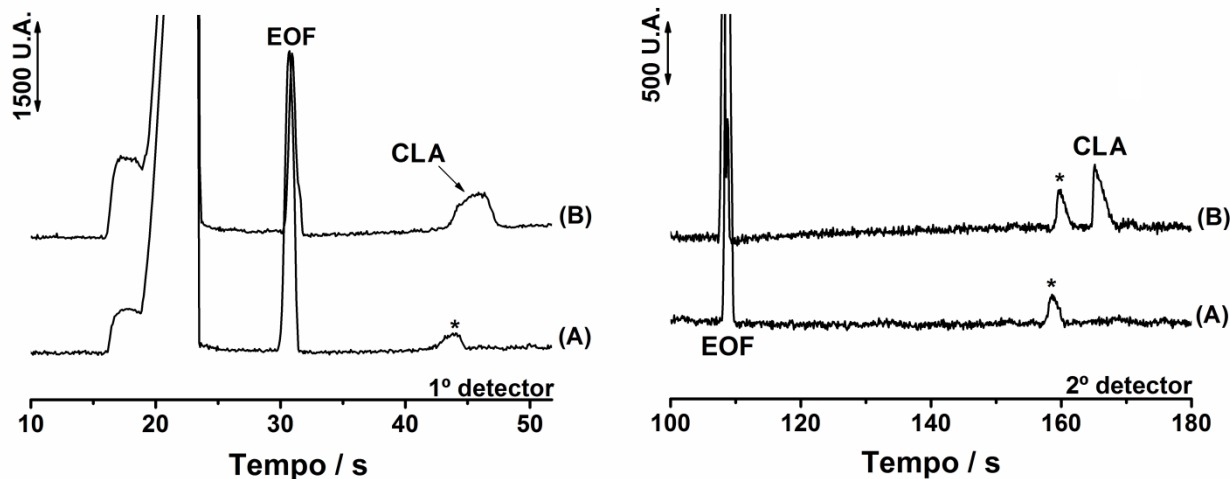
A estabilidade do composto CLA também foi avaliada em meio ácido. A Figura 21 mostra os eletroferogramas de uma solução padrão de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCLA dissolvido em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 24 h (A). Após 24 h, nenhum pico foi detectado para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CLA em meio ácido (A). No entanto, após a adição, na mesma solução, de uma alíquota de solução de KCLA recentemente preparada, detectou-se um pico para CLA (B). Este resultado (degradação total de CLA em meio ácido) também está de acordo com a literatura [177].

Figura 21. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo 1 mmol L^{-1} de KCLA dissolvido em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 durante 24 h sem (A) e com (B) a adição de mais 1 mmol L^{-1} de KCLA. Demais condições, ver figura 15.



A estabilidade do CLA também foi avaliada em meio básico. A Figura 22 apresenta eletroferogramas no 1º e 2º detector de uma solução padrão de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ KCLA dissolvido em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante 24 h (A). Analisando os eletroferogramas obtidos no 1º detector, após 24 h, um pico foi detectado para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de CLA (em meio básico) com tempo de migração próximo ao tempo de migração do CLA e após a adição de uma alíquota de solução de KCLA recentemente preparada na mesma solução, verificou-se um aumento ou alargamento deste pico. No segundo detector, uma melhor análise pode ser realizada, pois devido ao maior comprimento efetivo do capilar, foi possível verificar uma melhor resolução entre o pico desconhecido e o pico referente ao CLA adicionado. Assim, pode-se concluir, que o CLA também degrada em meio básico.

Figura 22. Eletroferogramas obtidos no 1º e 2º detector a partir da injeção de soluções padrão contendo 1 mmol L⁻¹ de KCLA dissolvido em 0,1 mol L⁻¹ de NaOH durante 24 h sem (A) e com (B) a adição de mais 1 mmol L⁻¹ de KCLA . Demais condições, ver figura 15.



4.1.2. Conclusões parciais

As vantagens da utilização de CE-C⁴D na determinação simultânea de AMX, CLA e K em amostras farmacêuticas foram demonstradas. O procedimento proposto é preciso, seletivo, exato, rápido (75 injeções h⁻¹) e requer quantidades muito pequenas de amostras e reagentes, além de não fazer uso de solventes orgânicos na composição do BGE. No trabalho proposto, um instrumento CE construído em laboratório com um detector de baixo custo foi usado (~ USD 160,00), portanto, pode ser considerado como um sistema de análise de baixo custo. Além disso, o método proposto pode ser aplicado para verificar a degradação do CLA por determinação estequiométrica de K e CLA. Na tabela 8 foi feita uma comparação entre as técnicas HPLC, descritas na literatura, e CE-C⁴D, utilizada neste trabalho.

Tabela 8. Comparação das características das técnicas HPLC e CE-C⁴D.

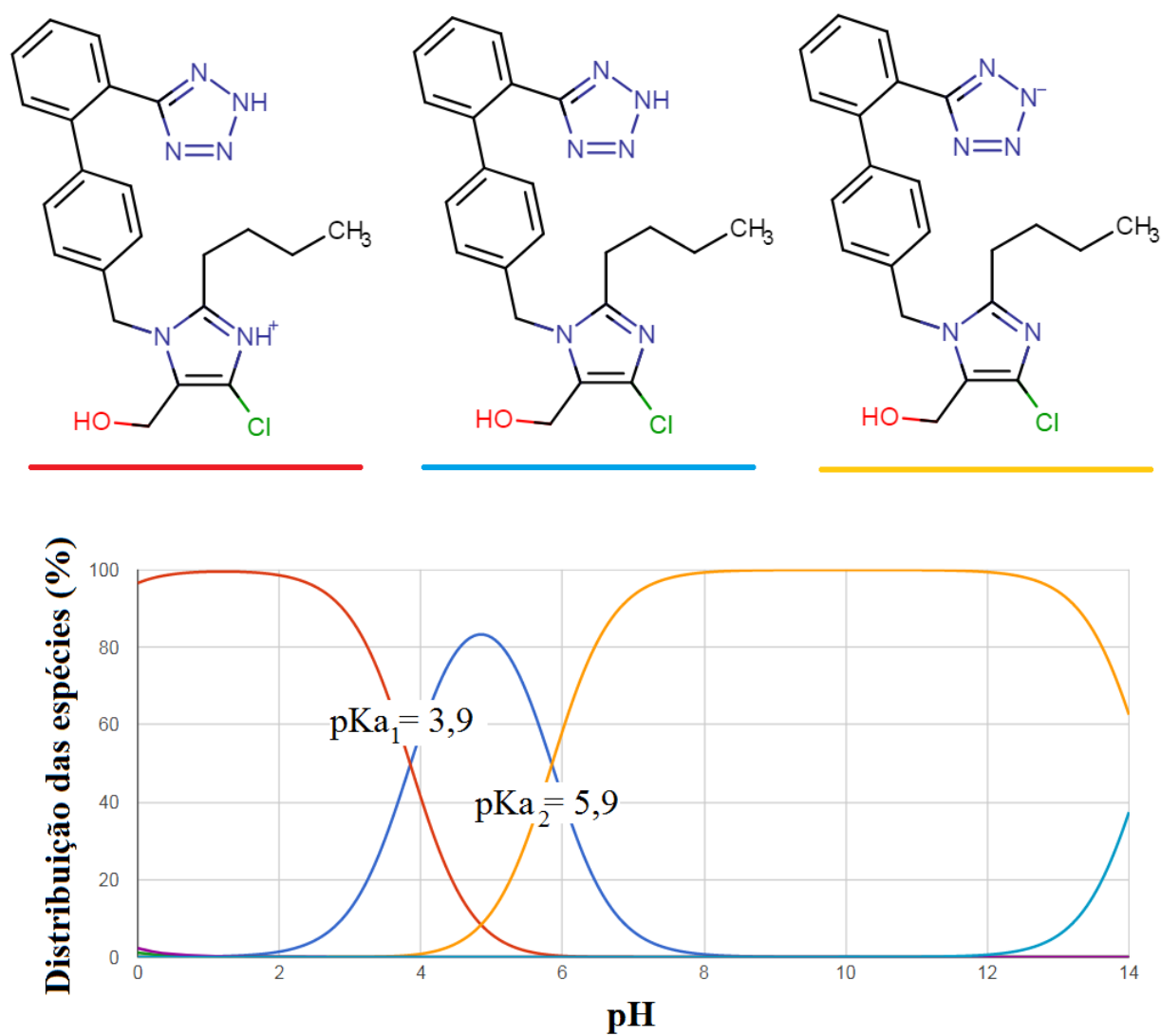
	HPLC	CE-C⁴D
Velocidade	moderada (~10 min por análise)	alta (~45 s por análise)
Custo do equipamento	alto	moderado
Custo operacional	alto	baixo
Detectabilidade	alto	moderado
Eficiência	moderada	alta
Automação	sim	sim
Precisão	excelente	boa
Robustez	excelente	boa
Consumo de reagentes	alto (~10 mL por análise)	mínimo (nL por análise)
Geração de resíduos	alta	mínima

4.2. Determinação simultânea de KLOS e HCT

De acordo com os dados obtidos na literatura [7], os valores de pKa dos analitos estudados são: LOS = 3,9 e 5,9, e HCT = 9,1, 9,8 e 11,3 . Estes valores de pKa indicam que as duas espécies podem existir nas suas formas iônicas em soluções aquosas e, portanto, podem ser separadas por CZE. A LOS é uma molécula anfótera ($pI = 4,9$) e pode existir tanto na sua forma catiônica ($pH < 4,9$) quanto na sua forma aniônica ($pH > 4,9$). Nas formulações farmacêuticas a LOS possui como contra íon o cátion K^+ na proporção 1:1 [178]. Já a HCT existe na forma aniônica em soluções com pH superior a 7,1. A fim de conseguir a determinação desses três analitos (K, HCT e LOS) simultaneamente, uma condição que permitisse a determinação simultânea de cátions e ânions por CZE foi avaliada.

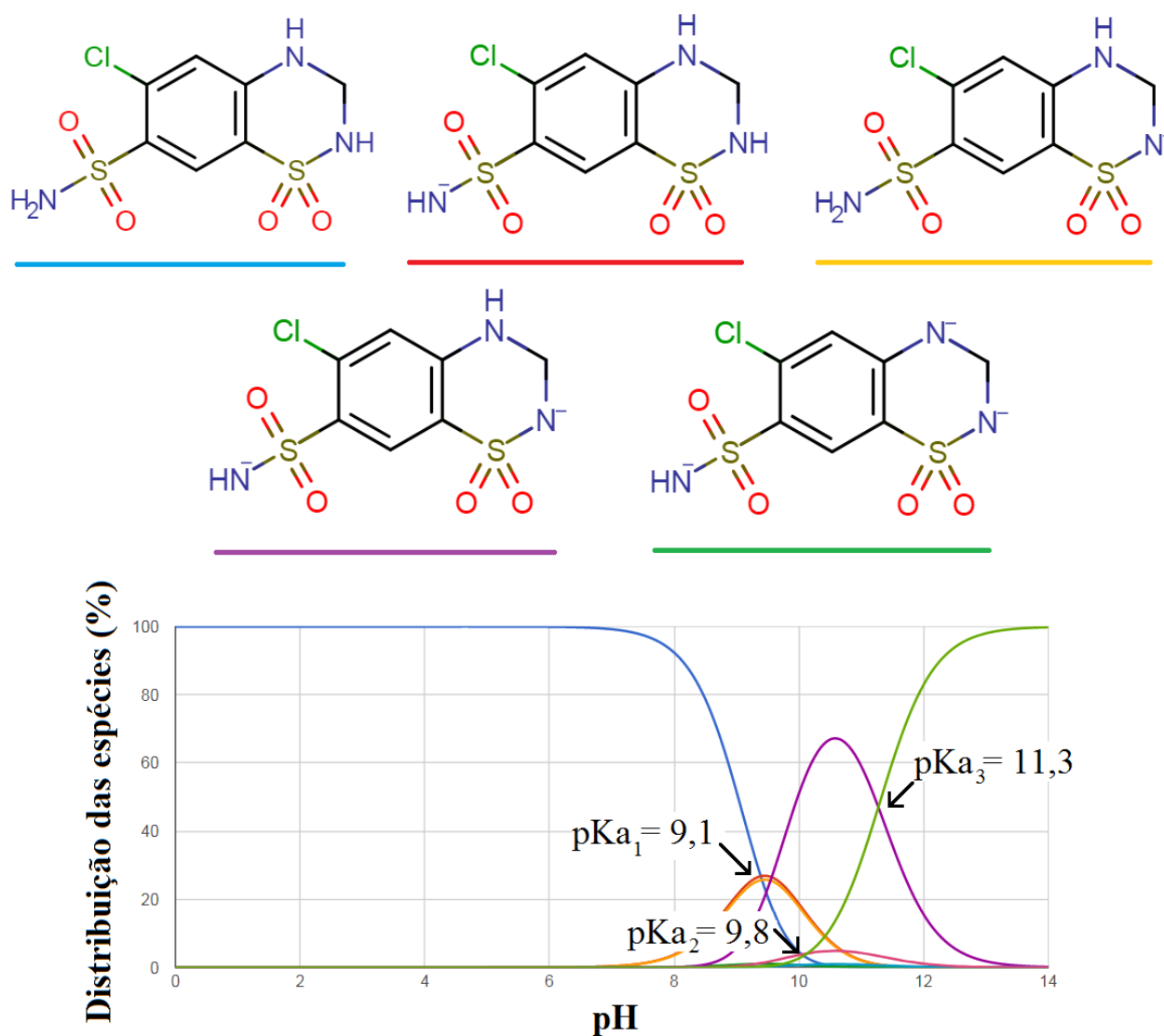
Uma análise das curvas de porcentagem de distribuição das espécies versus pH (Figuras 23 e 24) permite uma avaliação preliminar das faixas de pH onde a separação é possível por CZE. Como em pH inferior a 7,1, a HCT não está ionizada, ou seja, tem mobilidade zero, a determinação simultânea destes compostos só poderá ser feita em BGEs com valores de pH maiores que 7,1. Nestas condições, a LOS também estará na sua forma aniônica e as duas espécies, juntamente com o contra íon da losartana (K), poderão ser analisados por CZE. Desta forma, a estratégia adotada neste trabalho para a determinação rápida e simultânea dos três compostos (K, HCT e LOS) por CZE foi o uso de EOF normal com alta mobilidade ($pH \geq 7,5$, quase 100% dos grupos silanóis ionizados). Nesta condição, cátions irão migrar rapidamente em direção ao detector (EOF normal + mobilidade eletroforética de cátions) e ânions de baixa mobilidade eletroforética serão levados até o detector pelo EOF (mobilidade do EOF \gg mobilidade eletroforética de ânions). Nesta condição, o cátion (K) será detectado antes do EOF e os ânions (HCT e LOS) serão detectados imediatamente após o pico do EOF (água + moléculas neutras; C^4D).

Figura 23. Curva da relação de carga versus pH da molécula de LOS.



Fonte: Modificada de [7]

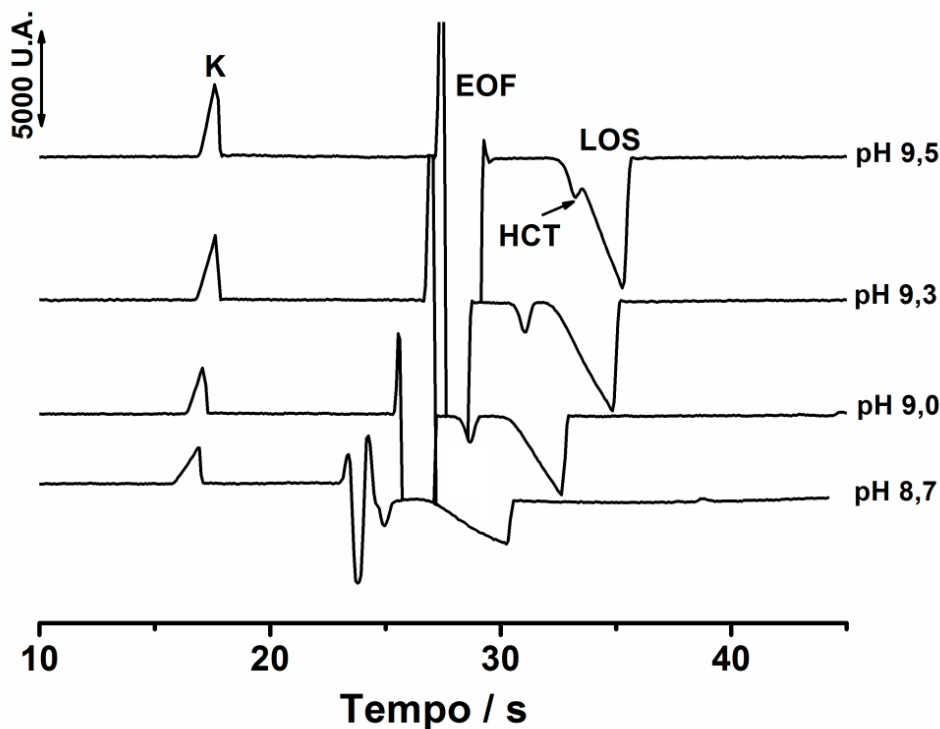
Figura 24. Curva da relação de carga versus pH da molécula de HCT.



Fonte: Modificada de [7]

Inicialmente foi feito um estudo utilizando o BGE composto por 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico e pH ajustado com NaOH. O estudo foi realizado na faixa de pH em que o ácido bórico (pKa = 9,2) tem capacidade tamponante (Figura 25).

Figura 25. Eletroferogramas obtidos com a variação de pH na separação de K, HCT e LOS por CZE. Concentrações dos analitos: $650 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KLOS e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT. BGE: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico com pH ajustado com NaOH; Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.



Como pode ser observado, a separação destas espécies pode ser feita na faixa de pH entre 9,0 e 9,3 pois uma resolução adequada é obtida para todos os analitos nesta faixa de pH (Tabela 9). Os eletroferogramas mostram que o pico da HCT se distancia do sinal do EOF e se aproxima do sinal da LOS com o aumento do pH do BGE (8,7 a 9,5), pois as moléculas na sua forma neutra são convertidas em ânions com o aumento do pH. Em pH 9,5, já não é mais possível ter a separação das espécies HCT e LOS, pois elas começam a adquirir mobilidades e tempos de migração semelhantes. Como nessa faixa de pH estudada, as moléculas de LOS já estão 100% na sua forma aniônica, não foi observada diferença significativa no tempo de migração desta espécie em relação a variação do pH. A diferença do tempo de migração apresentada nos eletroferogramas é devido a variação das concentrações dos BGEs. Nestas condições, além da possibilidade da

determinação rápida e simultânea HCT e LOS em formulações farmacêuticas, uma caracterização estequiométrica da losartana potássica (KLOS) também é possível em cada análise.

Tabela 9. Resolução entre os picos de HCT e LOS em função do pH do BGE.

Valor do pH	Resolução*	
	HCT	LOS
8,7	0,9	2,3
9,0	1,6	2,1
9,3	2,2	1,7
9,5	-	-

*Calculado entre o pico do analito e o pico anterior. No caso da HCT o pico anterior é o EOF.

Posteriormente, foram estudados os efeitos de diferentes composições de BGEs sobre a eficiência de separação das três espécies (Figura 26). Três tampões foram avaliados: 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico, 10 mmol L⁻¹ de CHES e 10 mmol L⁻¹ de HIS, todos ajustados para pH = 9 com NaOH.

Figura 26. Eletroferogramas obtidos com a variação da composição do BGE na separação de K, LOS e HCT por CZE. Concentrações dos analitos: $650 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KLOS e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT. BGEs: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico; 10 mmol L^{-1} de HIS; 10 mmol L^{-1} CHES; todos ajustados para $\text{pH} = 9$ com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.

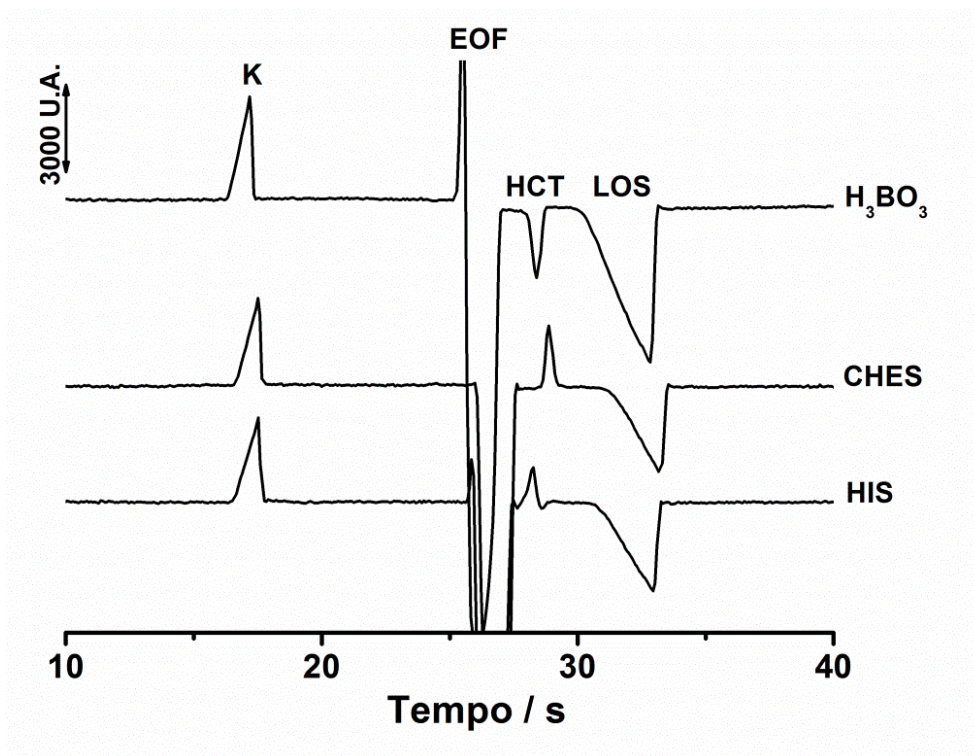


Tabela 10. Área do pico e resolução apresentadas na separação das espécies K, HCT e LOS em diferentes BGEs.

		H₃BO₃	CHES	HIS
Área do pico (U.A)	K	28,0	24,7	25,5
	HCT	14,2	10,7	7,9
	LOS	126,3	52,6	58,5
Resolução*	K	5,9	6,4	6,0
	HCT	1,7	1,8	1,1
	LOS	2,2	2,7	2,8

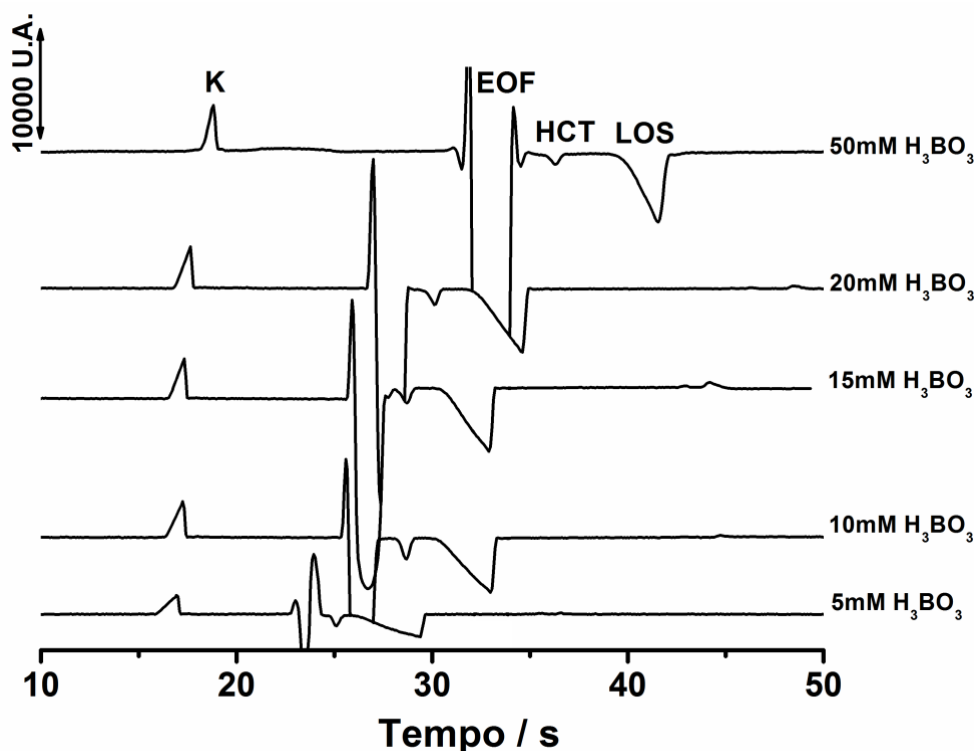
*Calculada entre o pico do analito (HCT e LOS) e o pico anterior ou entre o pico do analito (K) e pico posterior.

Observou-se que, o BGE composto por 10 mmol L^{-1} de ácido bórico apresentou o melhor resultado, proporcionando uma adequada resolução e boa detectabilidade aos analitos em estudo

(Tabela 10). Neste BGE, os picos referentes a HCT e LOS tiveram comportamento semelhantes apresentando picos negativos (mobilidade menor do que a mobilidade do tampão).

Em seguida, foi realizado um estudo de concentração do tampão no qual a concentração do ácido bórico foi variada de 5 a 50 mmol L⁻¹, com pH = 9 ajustado com NaOH (Figura 27). Pode-se observar que o tampão composto por 10 mmol L⁻¹ de ácido bórico apresentou o melhor resultado (menor tempo de análise, picos menos assimétricos e largos) e este foi o escolhido para a continuação dos estudos.

Figura 27. Eletroferogramas obtidos em diferentes concentrações do BGE utilizando uma solução padrão de KLOS e HCT. Concentrações dos analitos: 650 μmol L⁻¹ de KLOS e 250 μmol L⁻¹ de HCT. BGEs: 5, 10, 15, 20 e 50 mmol L⁻¹ de ácido bórico pH = 9,0 ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



No próximo estudo, a influência do potencial de separação (+15 a +25 kV) foi avaliada (Figura 28). O melhor desempenho quando avaliou-se concomitantemente resolução (Tabela 11) e tempo de análise foi obtido utilizando +20 kV como potencial de separação.

Figura 28. Eletroferogramas obtidos em diferentes potenciais de separação utilizando uma solução padrão de KLOS e HCT. Concentrações dos analitos: 650 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de KLOS e 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT. BGE: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico pH = 9,0 ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: variando de +15 kV a +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.

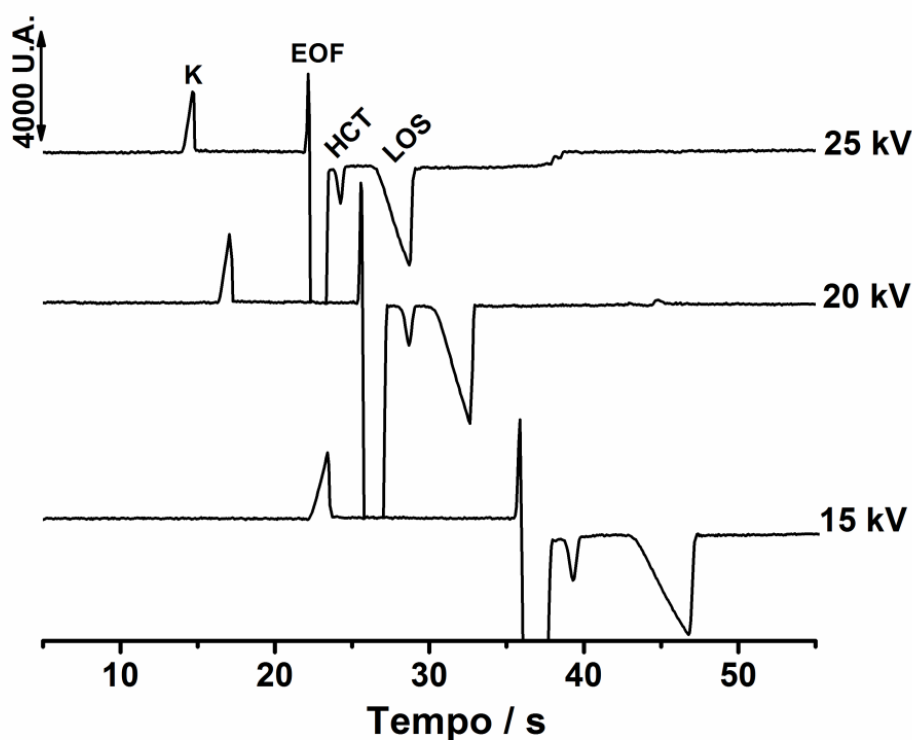


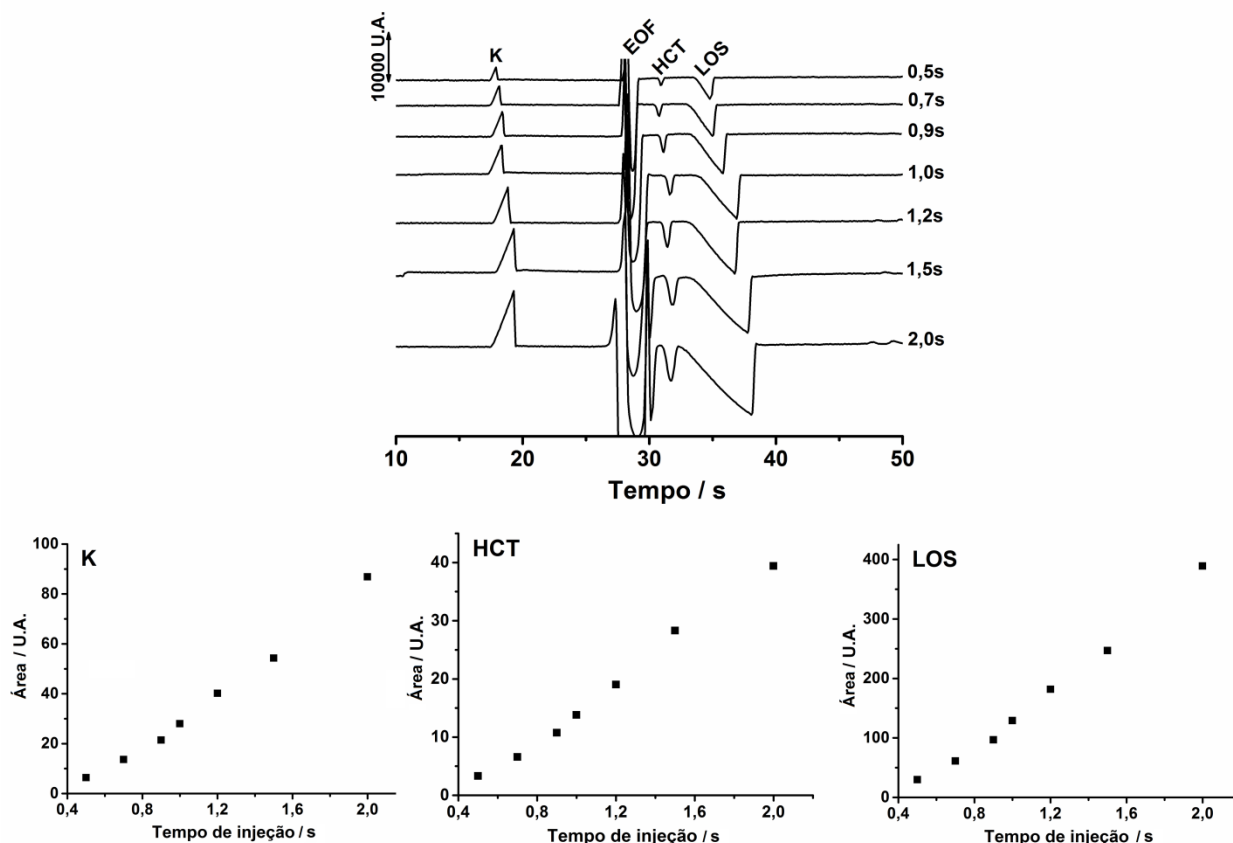
Tabela 11. Resolução apresentada na separação das espécies HCT e LOS em relação ao potencial de separação.

Potencial (kV)	Resolução*	
	HCT	LOS
15	1,49	2,58
20	1,54	1,77
25	1,57	2,49

*Calculada entre o pico do analito e o pico anterior. Para HCT o pico anterior é o EOF.

Em seguida foi realizado o estudo do tempo de injeção (0,5 s a 2s) (Figura 29).

Figura 29. Eletroferogramas obtidos no estudo do tempo de injeção utilizando soluções padrões contendo KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e respectivos gráficos mostrando a relação do tempo de injeção com a área dos picos. BGE: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico pH = 9,0 ajustado com NaOH; Pressão de injeção: 25 kPa; Potencial de separação: +20 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Como pode ser observado na Figura 29, em tempos de introdução maiores tem-se uma maior área para os picos, uma vez que uma maior quantidade de analito é introduzida no capilar, no entanto, elevados tempos de injeção podem afetar negativamente a resolução. O tempo de injeção de 1 s proporcionou picos menos assimétricos e largos, adequada detectabilidade e foi o selecionado para as demais análises. A linearidade ($r \geq 0,998$ para todos os analitos) obtida do tempo de injeção da amostra em função do sinal analítico indica que o sistema de injeção é

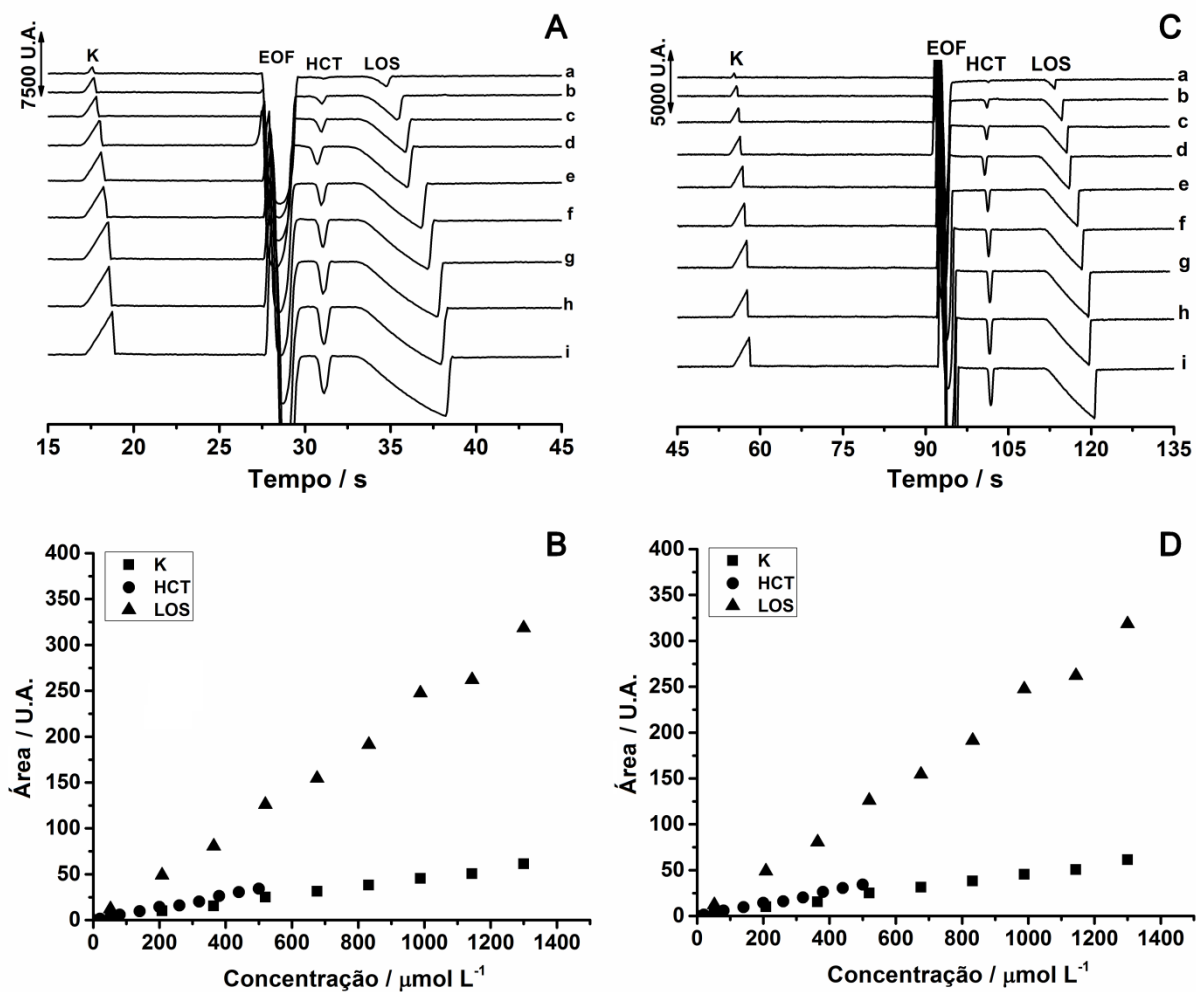
eficiente e reprodutivo. Um resumo dos parâmetros estudados e respectivos valores com as melhores condições é apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Relação dos parâmetros operacionais otimizados do método de determinação de K, LOS e HCT por CE-C⁴D.

Parâmetros	Intervalo estudado	Valor otimizado
pH do BGE	8,7 - 9,5	9,0
Concentração do BGE (mmol L ⁻¹)	5 - 50	10
Potencial de separação (kV)	15 - 25	20
Tempo de injeção (s) à 25 kPa	0,5 - 2,0	1,0
Comprimento efetivo do capilar (cm)	10 e 40	10 e 40

Após os testes de otimização do método, deram início aos testes para avaliar a precisão e exatidão do mesmo. Primeiramente, foi avaliada a linearidade do método, no primeiro e segundo detectores, para os analitos em estudo (Figura 30).

Figura 30. Eletroferogramas obtidos no primeiro (A) e segundo (C) detectores a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS (a – i: 52 - 1300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (a – i: 20 - 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e as respectivas relações de concentração e sinal dos analitos no primeiro (B) e segundo (D) detector ($n = 3$). BGE: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico pH = 9,0 ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +20 kV (lado da injeção); Comprimento total do capilar: 50 cm; Comprimento efetivo do capilar 10 cm (1° detector) e 40 cm (2° detector); EOF: normal.

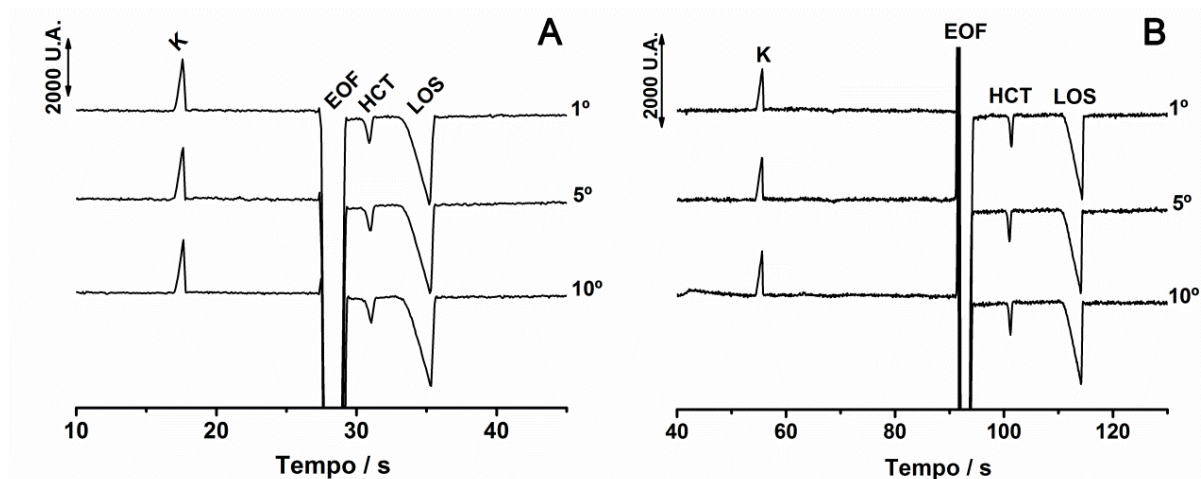


Na Figura 30 pode-se visualizar os eletroferogramas obtidos para concentrações crescentes de K (52 a 1300 $\mu\text{mol L}^{-1}$), HCT (20 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e LOS (52 a 1300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) no primeiro detector (A) e a relação entre a concentração das espécies e a área dos picos (B). Além disto, os eletroferogramas obtidos para as mesmas soluções no segundo detector (C) e sua relação de concentração versus área dos picos (D). Observa-se que, em ambos os detectores, até mesmo

em elevadas concentrações tem-se resolução adequada e boa relação linear entre concentração e sinal analítico para todos os analitos estudados com coeficientes de correlação maiores que 0,995. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 [174]. Posteriormente, uma menor faixa de concentração, foi adotada para construção das curvas de calibração. Embora no segundo detector os picos sejam mais finos e simétricos e, apresentem melhor resolução, a frequência analítica aumenta cerca de quatro vezes em relação ao primeiro detector. Nesse caso, a fim de se obter um método rápido, as análises no primeiro detector são perfeitamente possíveis, mesmo que com menor resolução. Com o intuito de fazer uma comparação entre detectores, os resultados em ambos serão mostrados.

A fim de avaliar a estabilidade do sistema, procedeu-se com o estudo de repetibilidade. O desempenho do sistema é mostrado na Figura 31 com o primeiro, quinto e décimo eletroferogramas obtidos no primeiro e segundo detectores a partir da injeção de uma solução padrão contendo KLOS e HCT.

Figura 31. Eletroferogramas obtidos no primeiro (A) e segundo (B) detectores para o estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver Fig. 30.



Os resultados estatísticos calculados a partir dos eletroferogramas são apresentados na Tabela 13. Este estudo mostrou que o método proposto apresenta boa repetibilidade de injeção, com desvios padrões relativos inferiores a 4,6 e 0,6% em relação à área dos picos e tempos de migração, respectivamente para todos os analitos. Isto mostra que não há necessidade da renovação do BGE (flush) no capilar ao longo de dez análises sucessivas. Foi realizado também o estudo de precisão intermediária inter-dias, no qual foi feita a injeção da mesma solução padrão em três dias diferentes, apresentando desvios padrões relativos inferiores a 12,9% e 2,1% em relação à área dos picos e tempo de migração, respectivamente. Este resultado indica a necessidade da calibração diária para a obtenção de resultados mais precisos. No entanto, segundo a ANVISA, são aceitáveis valores de RSD menores que 20% [174]. Também estão apresentadas na Tabela 13 todas as características analíticas do método. Dentre estas estão os LOD que foram calculados de forma experimental, por apresentar resultados mais reais. Foram feitas injeções dos analitos (KLOS e HCT) no equipamento, utilizando concentrações cada vez mais baixas (diluição progressiva), até que o sinal do pico do analito fosse três vezes maior do que o ruído de fundo.

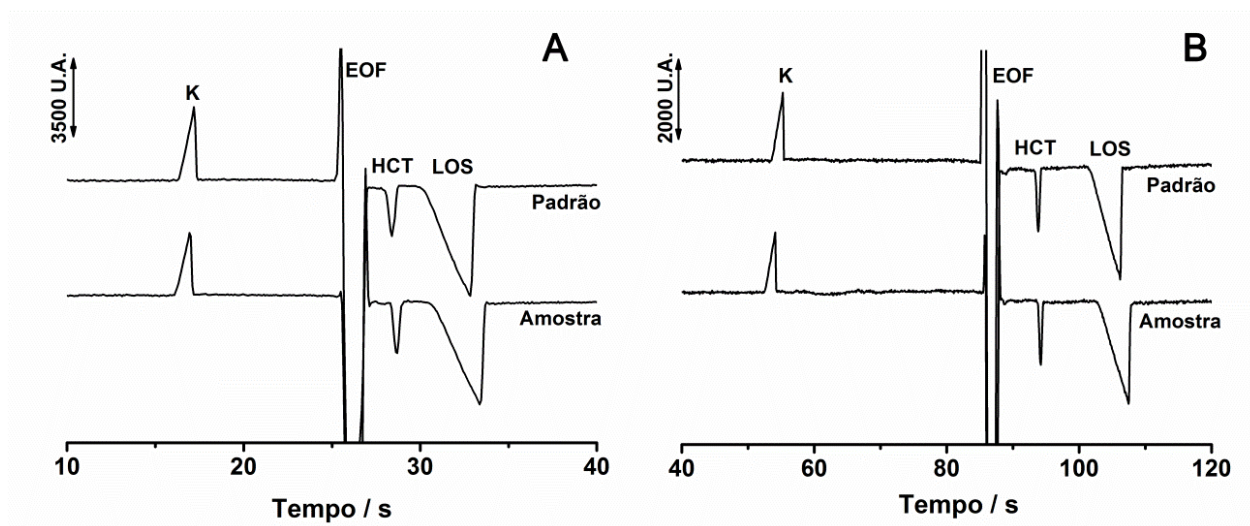
Tabela 13. Características analíticas do método proposto (valor \pm SD).

	K		HCT		LOS	
	1° detector	2° detector	1° detector	2° detector	1° detector	2° detector
Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	130 - 780	130 - 780	50 - 300	50 - 300	130 - 780	130 - 780
r	0,999	0,998	0,997	0,998	0,999	0,997
Tempo de migração (s)	17,6 \pm 0,1	55,6 \pm 0,1	30,9 \pm 0,1	101,1 \pm 0,2	35,2 \pm 0,1	114,0 \pm 0,3
RSD intra-dia (%; n = 10)	2,8	3,8	3,3	4,6	0,5	1,5
RSD inter-dias (%; n = 3)	4,5	5,0	6,1	7,2	2,1	3,0
LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$; S/N = 3)	4	5	10	11	3	3
LOD (mg L^{-1} ; S/N = 3)	0,2	0,2	3,0	3,3	1,3	1,3
Frequência analítica (h^{-1})	102	32	102	32	102	32
Resolução*	6,9 \pm 0,2	15,1 \pm 0,3	1,7 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	2,4 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1

*Calculado entre o pico do analito (HCT e LOS) e o pico anterior ou entre o pico do analito (K) e o pico posterior.

A Figura 32 apresenta um eletroferograma típico de uma solução padrão contendo KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e um eletroferograma de uma solução preparada a partir de uma formulação farmacêutica comercial, no primeiro (A) e segundo (B) detectores. Estes resultados demonstram a possibilidade de se realizar a determinação de compostos em formulações farmacêuticas contendo KLOS e HCT, pois sobreposições ou picos adicionais provenientes de interferentes (excipientes, por exemplo) não foram detectados.

Figura 32. Eletroferogramas obtidos no primeiro (A) e segundo (B) detector de uma solução padrão e amostra contendo KLOS+HCT. Concentração dos analitos: $650 \mu\text{mol L}^{-1}$ de KLOS e $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HCT. Demais condições ver figura 30.



As Figuras 33 e 34 apresentam os eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS e HCT, e suas respectivas curvas de calibração no primeiro e segundo detectores, respectivamente.

Figura 33. Eletroferogramas obtidos no primeiro detector de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS + HCT e suas respectivas curvas de calibração ($n = 3$). Concentrações: KLOS (a – f: 130 – 780 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (a – f: 50 – 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 30.

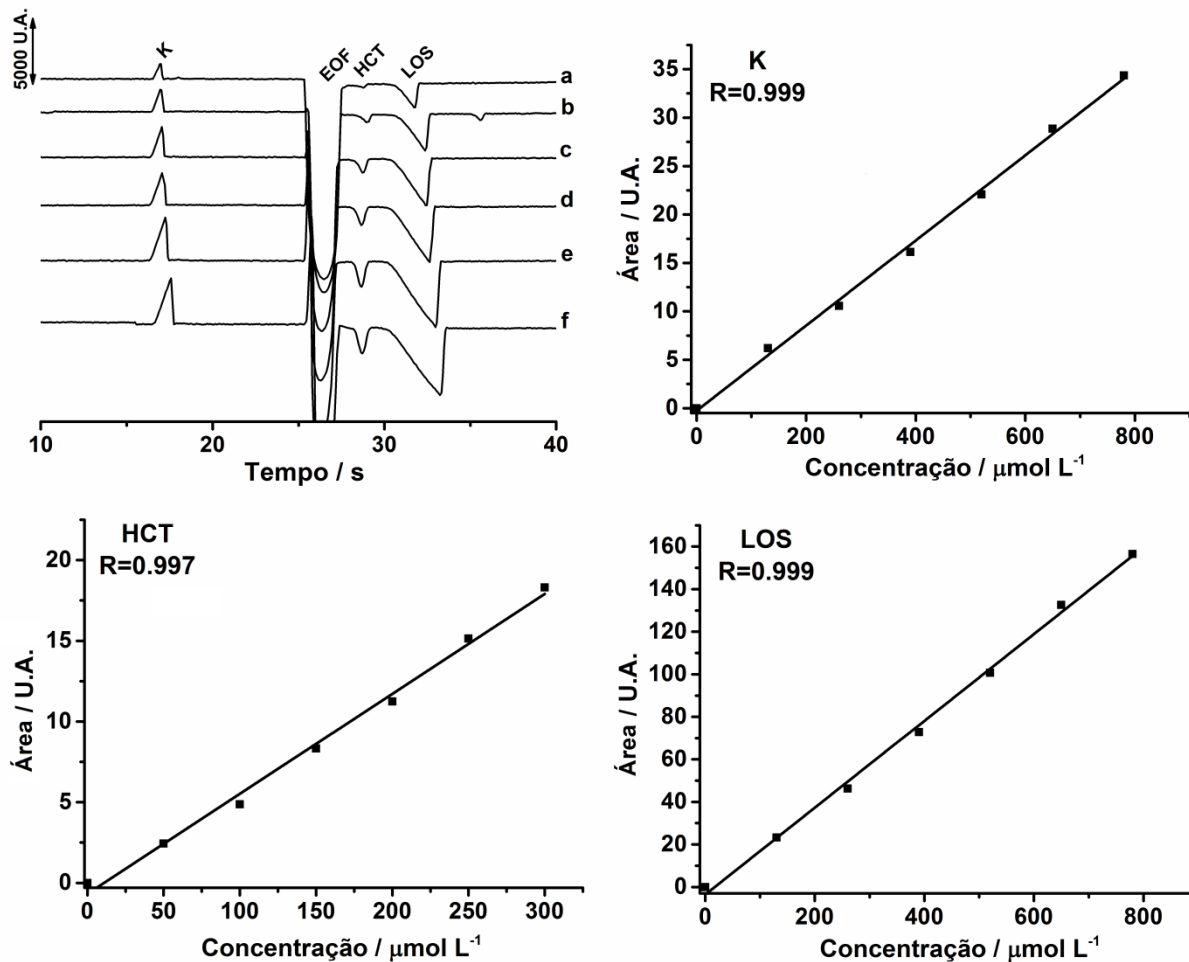
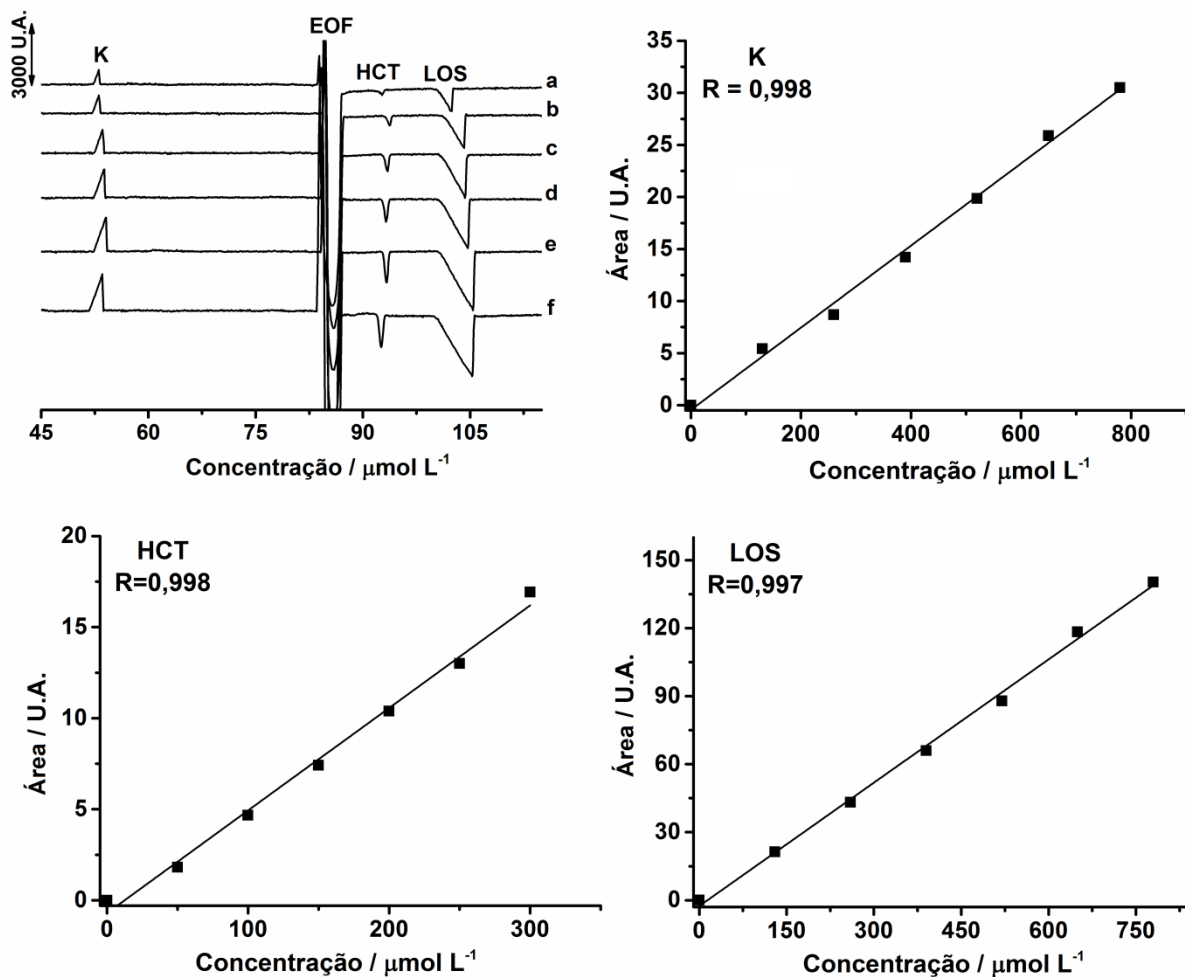


Figura 34. Eletroferogramas obtidos no segundo detector de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS + HCT e suas respectivas curvas de calibração ($n = 3$). Concentrações: KLOS (a – f: 130 – 780 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (a – f: 50 – 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 30.



A exatidão do método CE-C⁴D proposto foi avaliada através da análise de duas amostras de formulações farmacêuticas comerciais. A Tabela 14 apresenta uma comparação dos resultados obtidos na análise destas amostras por CE-C⁴D, HPLC-UV e os valores contidos na bula.

Tabela 14. Determinação de K, HCT e LOS em formulações farmacêuticas por CE-C⁴D (valor \pm SD; n = 3).

Amostra	Bula (mg/tablete)	HPLC (mg/tablete)	CE-C ⁴ D (mg/tablete)		D ₁ (%)		D ₂ (%)		
			1° detector	2° detector	1° detector	2° detector	1° detector	2° detector	
A1	K	4,20	-	3,86 \pm 0,02	3,80 \pm 0,10	- 8,09	-9,52	-	-
	HCT	12,50	11,84 \pm 0,20	11,51 \pm 0,22	11,59 \pm 0,28	-7,92	-7,28	-2,79	-2,11
	LOS	45,80	42,49 \pm 0,20	42,59 \pm 0,99	42,99 \pm 0,88	-7,01	-6,14	+0,23	+1,18
A2	K	4,20	-	3,97 \pm 0,04	3,90 \pm 0,03	-5,48	-7,14	-	-
	HCT	12,50	13,1 \pm 0,30	12,96 \pm 0,10	13,32 \pm 0,23	+3,68	+6,56	-1,07	+1,65
	LOS	45,80	44,29 \pm 0,20	44,14 \pm 0,58	46,20 \pm 0,15	-3,62	+0,87	-0,34	+4,31

D₁: Diferença entre CE-C⁴D e o valor que consta na bula. [(Valores encontrado na bula) – (Valores obtidos pelo método proposto)] / Valores encontrado na bula x100

D₂: Diferença entre CE-C⁴D e HPLC. Diferença: [(Valores obtidos por HPLC) – (Valores obtidos pelo método proposto)] / Valores obtidos por HPLC x100

Todos os resultados obtidos pelo método proposto (CE-C⁴D) são similares aos encontrados na bula demonstrando que o método é capaz de fazer a determinação de KLOS e HCT em formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos para HCT e LOS por CE-C⁴D foram comparados estatisticamente com os obtidos por HPLC usando o teste-*t* de Student pareado. Os valores de *t* calculados foram menores do que o valor tabelado (4,303; *n* = 3), o que indica que não houveram diferenças significativas entre os resultados (nível de confiança de 95%).

Os estudos de adição e recuperação apresentaram resultados satisfatórios, com recuperações no primeiro detector de (98 ± 3)%, (102 ± 4)% e (101 ± 2)% (*n* = 3) para K, HCT e LOS, respectivamente, e no segundo detector de (96 ± 4)%, (99 ± 4)% e (102 ± 3)% (*n* = 3) para K, HCT e LOS, respectivamente. Além disso, o sinal detectado para potássio também apresentou uma resposta linear em relação à concentração na mesma faixa de concentração da LOS, e, assim, a determinação estequiométrica do sal de KLOS também é possível. A relação estequiométrica teórica para o sal de KLOS é de 1:1 (concentração molar) [178]. No entanto, este resultado somente é obtido para a forma correta de sal, na ausência de impurezas, ou ainda, na ausência de degradação/hidrólise de LOS. Portanto, o método proposto proporciona resultados rápidos e confiáveis para a caracterização estequiométrica da matéria-prima de KLOS. Após a adição de KLOS a uma formulação farmacêutica, a caracterização estequiométrica só é possível se outros sais de potássio não são usados como excipientes nesta formulação.

4.2.1. Conclusões parciais

Este trabalho propôs um método novo, simples e rápido (102 injeções h⁻¹) utilizando CE-C⁴D para determinação simultânea de K, HCT e LOS em amostras farmacêuticas. O método apresentou seletividade e geração mínima de resíduos por análise. Este método também possui procedimentos simples, sem necessidade de preparo de amostra (apenas dissolução e diluição), sem etapas prévias de extração ou derivatização, e sem se fazer necessário o uso de padrão interno

(normalmente requisitado em análises por CE). Além disso, o método proposto pode ser usado para detectar indícios da degradação de LOS por determinação estequiométrica de K e LOS, desde que não tenha K no excipiente e desde que LOS não gere produto com mesmo tempo de migração de K. Não foi encontrado na literatura nenhum outro método que permita a análise simultânea de K e LOS.

4.3. Determinação de HCT e outros princípios ativos

Os desafios encontrados pela indústria farmacêutica vão muito além da estabilidade dos fármacos associados numa formulação e da dificuldade analítica no controle de qualidade. Sabe-se que é de grande importância o desenvolvimento de métodos capazes de quantificar princípios ativos em formulações farmacêuticas compostas (associação de dois ou mais fármacos) e que ao mesmo tempo apresentem características como simplicidade e rapidez. Quando se leva em consideração a constante expansão da indústria farmacêutica [179] e o aumento progressivo de novos fármacos sintetizados em laboratório, um método único capaz de realizar a análise de uma grande variedade de princípios ativos é de grande utilidade.

Dentro deste contexto, foram realizados testes utilizando condições já otimizadas anteriormente (Tabela 12) em amostras comerciais contendo o princípio ativo HCT em associação com outros princípios ativos como ATE, PRO, MET, VAL, BEN, CAP, ENA, LIS e RAM. Os resultados obtidos nesses testes estão relatados a seguir. A fim de comparação, os resultados obtidos anteriormente para HCT e KLOS também serão mostrados.

Analisando os pKas das espécies mostrados na Tabela 1 (página 28), pode-se concluir que as moléculas de ATE, PRO e MET são predominantemente catiônicas ($\geq 82\%$ das moléculas com cargas positivas) em soluções com $\text{pH} = 9$, já as moléculas de VAL, BEN, CAP, ENA, LIS e RAM são predominantemente aniônicas ($\geq 92\%$ das moléculas com cargas negativas) neste mesmo valor de pH . O fato das espécies de interesse estarem carregadas no valor de pH já otimizado, aliado ao fato de que em solução com $\text{pH} > 8$ tem-se a velocidade do EOF no valor máximo (determinação rápida de cátions no modo co-EOF e ânions lentos no modo contra-EOF), indicava a possibilidade de se realizar a determinação de HCT na presença destas espécies usando as condições já otimizadas.

As análises envolvendo HCT na presença das espécies aniônicas (LOS, VAL, BEN, CAP, ENA, LIS e RAM) poderiam ainda ser testadas adotando o uso de um inversor de fluxo (geralmente um tensoativo catiônico, por exemplo CTAB). Nesta condição, a ordem de migração das espécies será a seguinte: primeiro os ânions, seguidos pelas moléculas neutras e por último os cátions de baixa mobilidade. Quando as análises por CZE são realizadas com as espécies de interesse se movimentando (migrando) no interior do capilar na mesma direção do EOF tem-se um aumento na velocidade da análise (mobilidade eletroforética + mobilidade eletrosmótica = modo co-EOF) e normalmente uma melhor resolução entre os picos (mais estreitos). No entanto, o foco do trabalho foi direcionado em verificar a possibilidade de usar um único método na determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas que contém HCT e associações. Assim, o método desenvolvido para a determinação de HCT e KLOS foi testado para este fim.

Para uma melhor organização na apresentação dos resultados, as amostras foram divididas em 3 grupos conforme certa similaridade nas propriedades químicas dos respectivos princípios ativos. No grupo 1 estão ATE, MET e PRO (beta-bloqueadores). No grupo 2 estão KLOS e VAL (ARAII). Já no grupo 3 estão BEN, CAP, ENA, LIS e RAM (IECA).

A relação de concentração comumente encontrada entre os princípios ativos HCT:ATE, HCT:MET, HCT:PRO, HCT:KLOS, HCT:VAL, HCT:BEN, HCT:CAP, HCT:ENA, HCT:LIS e HCT:RAM é da razão, em massa, de 1:8; 1:8; 1:1,6; 1:4; 1:12,8; 1,3:1; 1:2; 1:1,6; 1:1,6; 2,5:1, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15. Quantidade comumente encontrada de HCT na presença de outros princípios ativos.

	Princípio ativo	Quantidade (mg/tablete)
1	Hidroclorotiazida	12,5
	Atenolol	100
2	Hidroclorotiazida	12,5
	Metoprolol	100
3	Hidroclorotiazida	25
	Propranolol	40
4	Hidroclorotiazida	12,5
	Losartana potássica	50
5	Hidroclorotiazida	12,5
	Valsartana	160
6	Hidroclorotiazida	6,3
	Benazepril	5
7	Hidroclorotiazida	25
	Captopril	50
8	Hidroclorotiazida	12,5
	Enalapril	20
9	Hidroclorotiazida	12,5
	Lisinopril	20
10	Hidroclorotiazida	12,5
	Ramipril	5

Inicialmente, soluções padrões contendo HCT+ATE, HCT+PRO, HCT+MET, HCT+KLOS, HCT+VAL, HCT+BEN, HCT+CAP, HCT+ENA, HCT+LIS e HCT+RAM foram injetadas no sistema CE-C⁴D nas condições otimizadas para a determinação de HCT e KLOS e mostradas na Tabela 12. Os eletroferogramas obtidos no primeiro (10 cm de coluna) e segundo (40 cm de coluna) detector para cada par de analitos estão mostrados nas Figuras 35, 36 e 37. A opção pelos valores de concentrações dos fármacos usadas nas soluções que foram injetadas está relacionada com as diferentes proporções encontradas em formulações farmacêuticas comerciais.

Figura 35. Eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo: (A) HCT ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATE ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MET ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 10 mmol L^{-1} de ácido bórico pH = 9,0 ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +20 kV (lado da injeção); Comprimento total do capilar: 50 cm; Comprimento efetivo do capilar 10 cm (1° detector) e 40 cm (2° detector); EOF: normal.

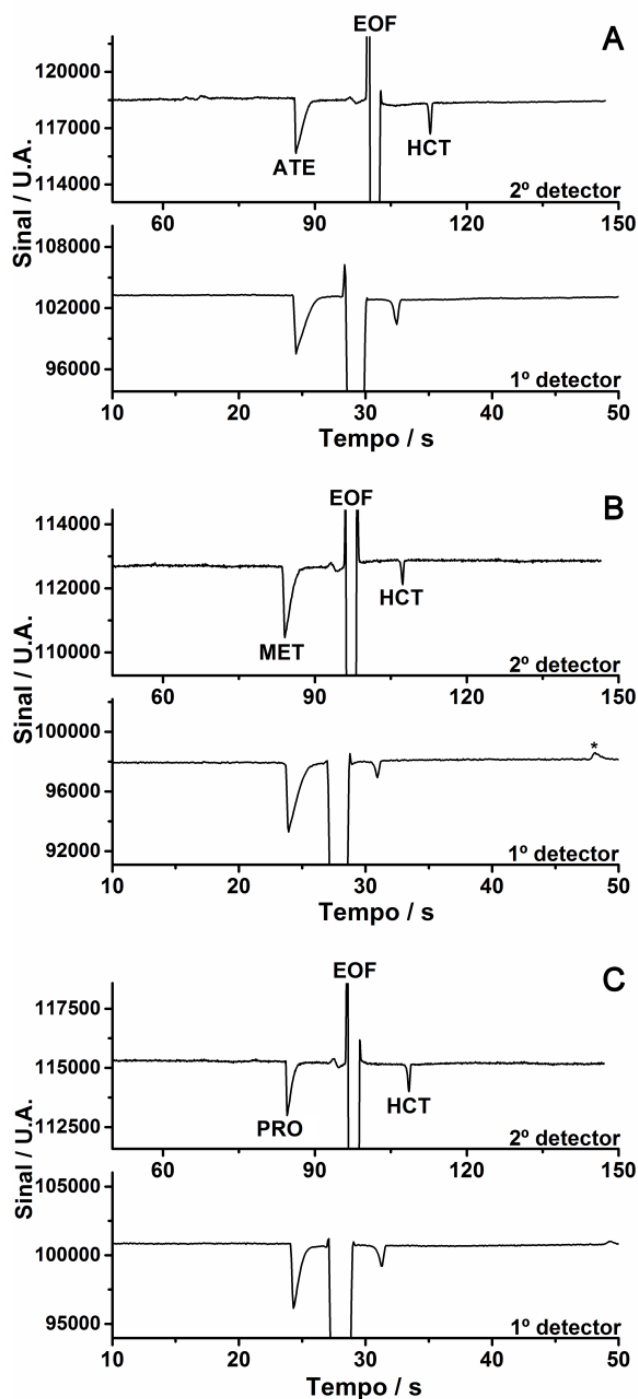


Figura 36. Eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo: (A) HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL ($653 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 35.

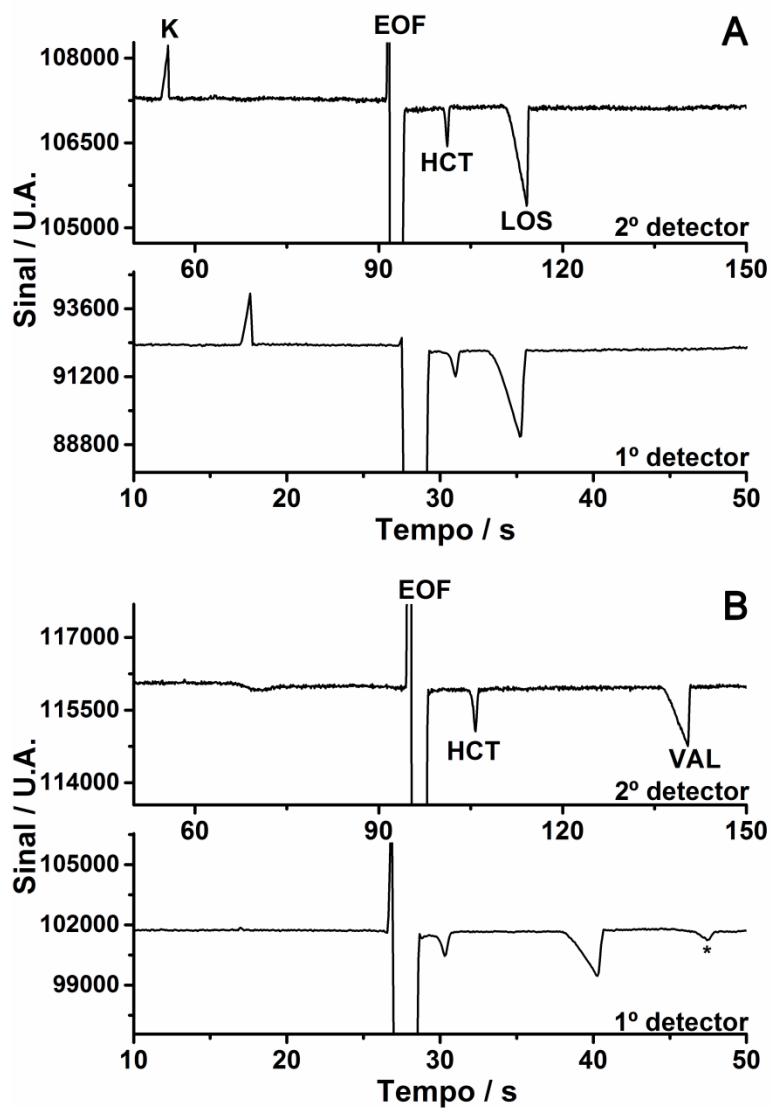
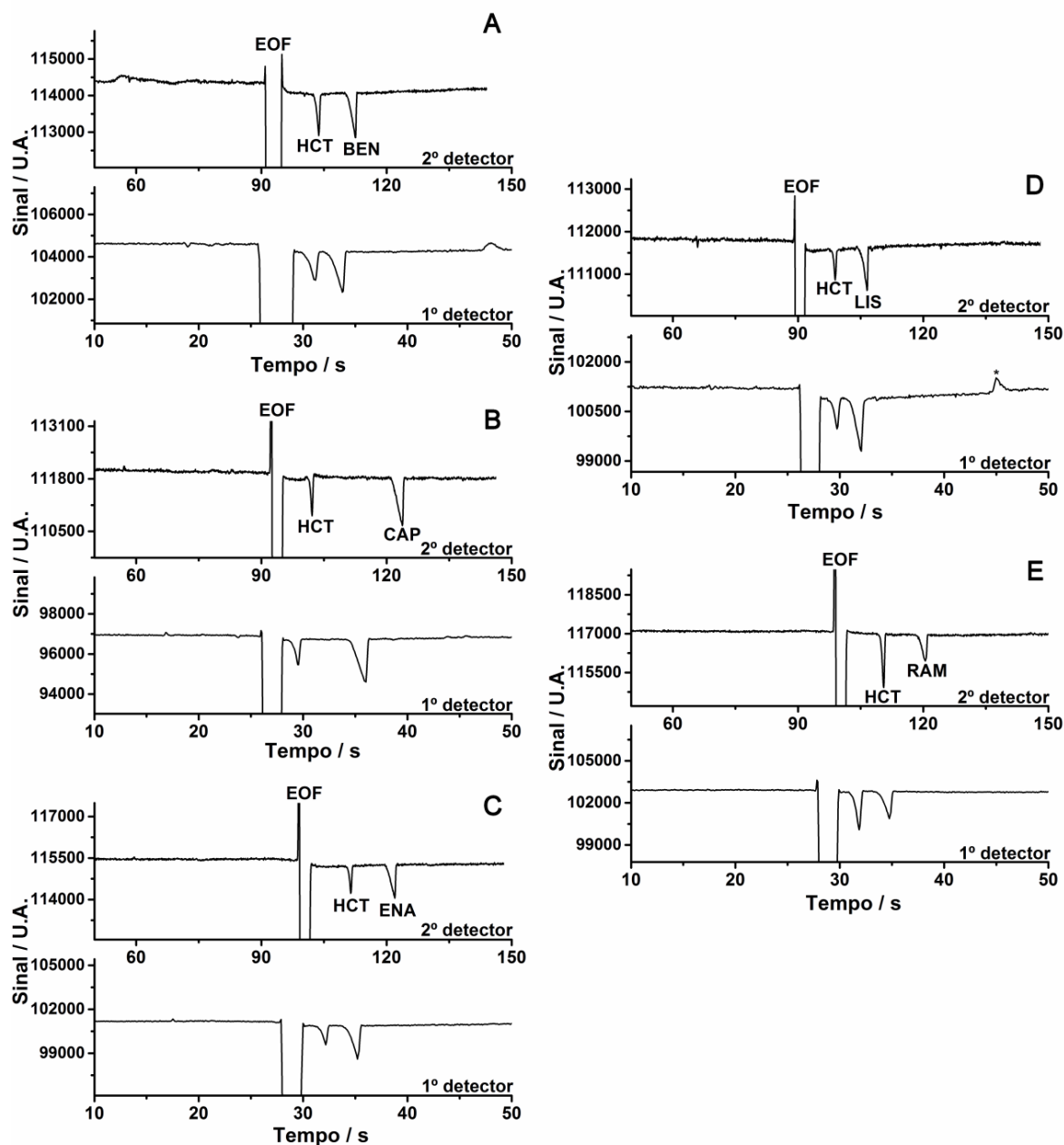


Figura 37. Eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo: (A) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA ($188 \mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (E) HCT ($350 \mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM ($117 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 35.



Como pode ser observado nas Figuras 35, 36 e 37, a separação de todas as espécies utilizando as condições otimizadas anteriormente para determinação de KLOS e HCT é possível. Todos os resultados obtidos confirmam os valores teóricos de pK_a encontrados na literatura [7] e apresentados na Tabela 1. Os eletroferogramas mostram sinais negativos para a maioria dos

analitos (menos para K), indicando que possuem menor mobilidade (condutividade) do que o BGE utilizado. Quanto maior for a diferença de mobilidade entre o BGE e o analito, maior é o sinal analítico. Observa-se também que alguns analitos (ATE/MET/PRO, BEN/LIS, ENA/RAM) possuem tempos de migração semelhantes, devido aos seus comportamentos e características similares (carga, massa molar e pKa), e não seria possível separá-los utilizando o método em estudo, o que impossibilitou a determinação destes em uma única corrida eletroforética.

A Tabela 16 mostra que a resolução entre os analitos no segundo detector é cerca de 2 vezes maior que a resolução no primeiro detector. No entanto, a separação obtida no primeiro detector é suficiente ($\geq 1,3$) para determinar estes analitos de forma seletiva, o que não justificaria o uso do segundo detector já que este apresenta um tempo de análise 3,5 vezes maior. Segundo descrito na literatura, valores de resolução acima de 1,25 são aceitáveis [180].

Tabela 16. Resolução obtida para os analitos no primeiro e segundo detector.

Analito	Resolução*	
	1º detector	2º detector
HCT	2,1	4,4
ATE	2,2	4,8
HCT	2,2	4,3
MET	1,8	3,8
HCT	2,0	4,5
PRO	1,8	3,9
HCT	1,7	3,6
LOS	2,4	4,9
HCT	1,4	5,3
VAL	3,3	11,8
HCT	1,3	3,3
BEN	1,6	3,7
HCT	1,3	3,3
CAP	4,0	9,0
HCT	1,7	4,3
ENA	2,3	4,8
HCT	1,8	3,8
LIS	1,7	4,0
HCT	1,5	3,9
RAM	1,9	4,7

*Calculado entre o pico do analito e o pico anterior. Exceto para ATE, MET e PRO (calculados entre o pico do analito e o EOF)

As Figuras 38, 39 e 40 apresentam uma comparação entre eletroferogramas obtidos para soluções padrão contendo HCT+ATE (Figura 38A), HCT+MET (Figura 38B), HCT+PRO (Figura 38C), HCT+KLOS (Figura 39A), HCT+VAL (Figura 39B), HCT+BEN (Figura 40A), HCT+CAP (Figura 40B), HCT+ENA (Figura 40C), HCT+LIS (Figura 40D) e HCT+RAM (Figura 40E) e eletroferogramas obtidos com soluções preparadas a partir de formulações farmacêuticas com composições similares. Estes resultados mostram a possibilidade de se realizar a determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas contendo esses fármacos, pois sobreposições ou picos adicionais provenientes de interferentes (excipientes, por exemplo) não foram detectados.

Figura 38. Comparação entre os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo: (A) HCT ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATE ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($75 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MET ($131 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções preparadas a partir de amostras com composições similares. Demais condições ver Figura 35.

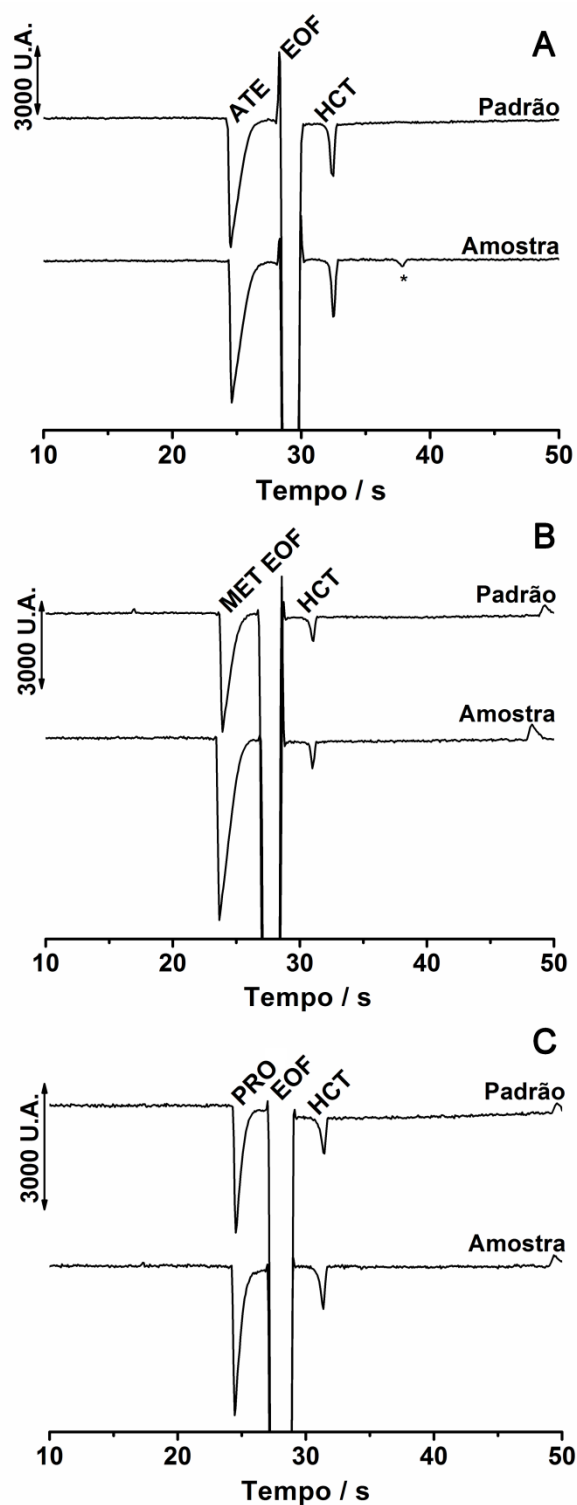


Figura 39. Comparação entre os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo: (A) HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL ($870 \mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções preparadas a partir de amostras com composição similares. Demais condições ver figura 35.

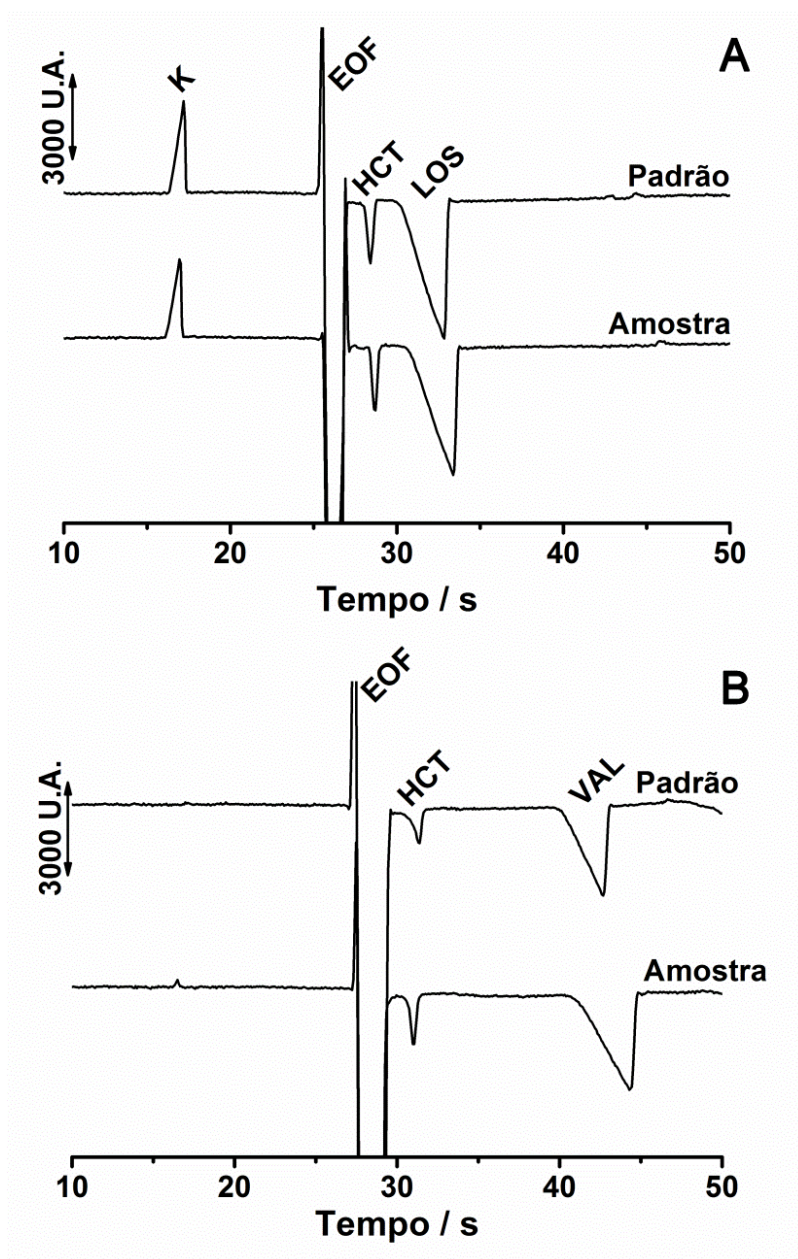
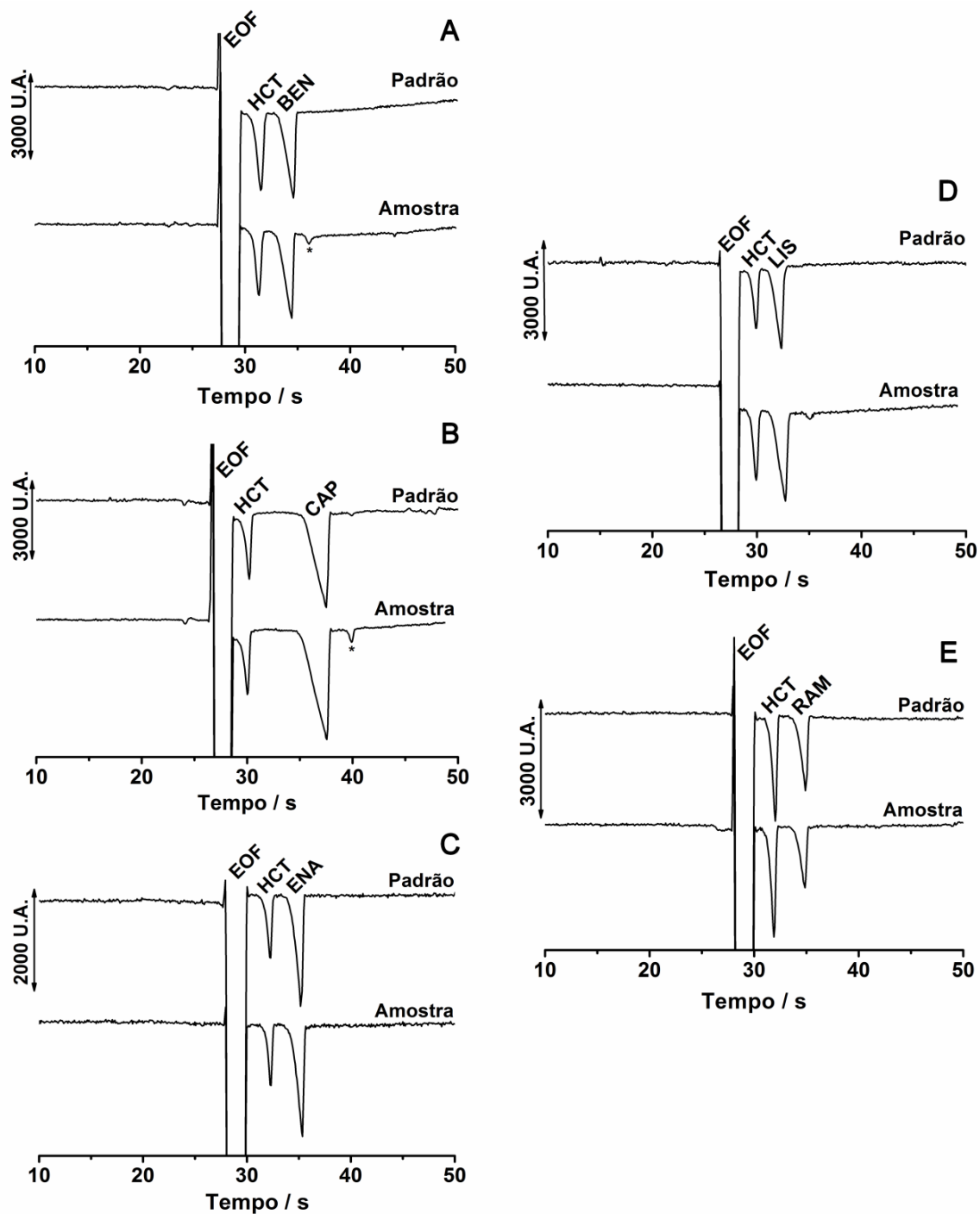


Figura 40. Comparação entre os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo: (A) HCT ($450 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA ($188 \mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$); (E) HCT ($350 \mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM ($117 \mu\text{mol L}^{-1}$) e soluções preparadas a partir de amostras com composição similares. Demais condições ver figura 35.



A fim de avaliar a precisão do sistema procedeu-se com os estudos de repetibilidade no qual foram feitas 10 injeções sucessivas de soluções padrão com composição similar a todas as amostras em estudo. O 1º, 5º e 10º eletroferogramas obtidos nesses estudos são mostrados nas Figuras 41, 42 e 43.

Figura 41. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão compostas por: (A) HCT ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ATE ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MET ($175 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 35.

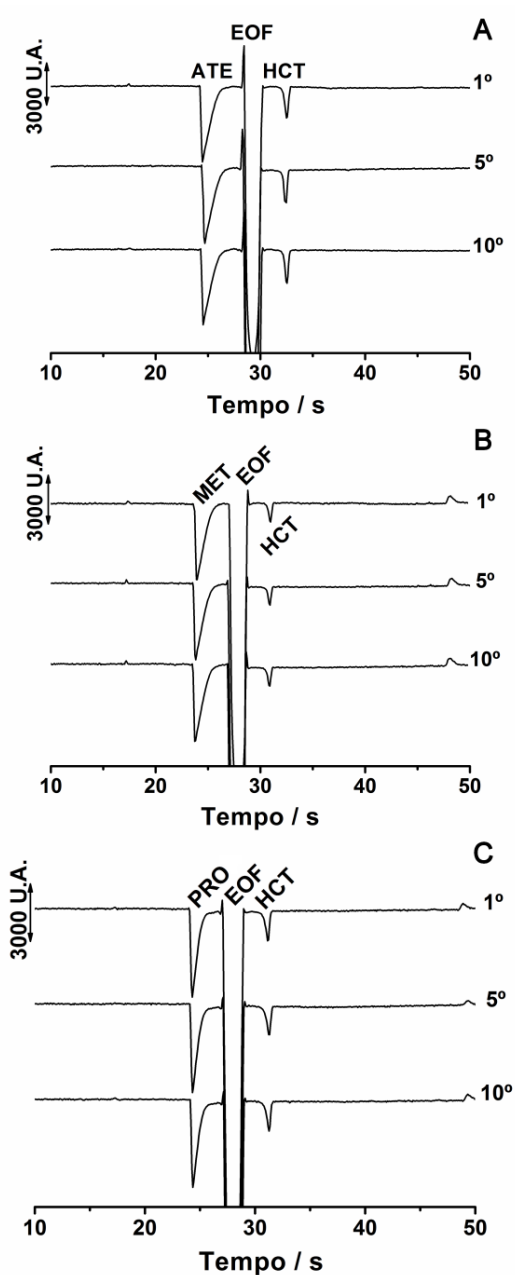


Figura 42. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por: (A) HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e KLOS ($650 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL ($653 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 35.

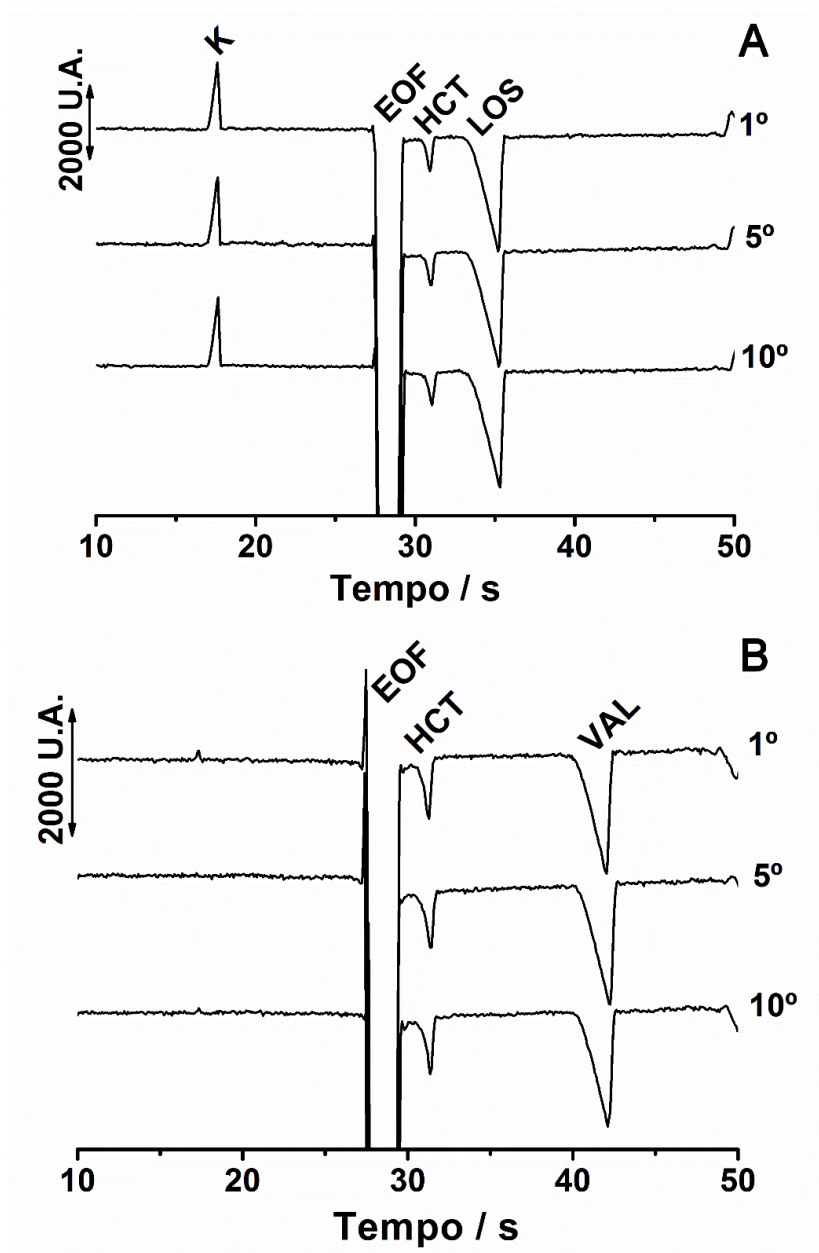
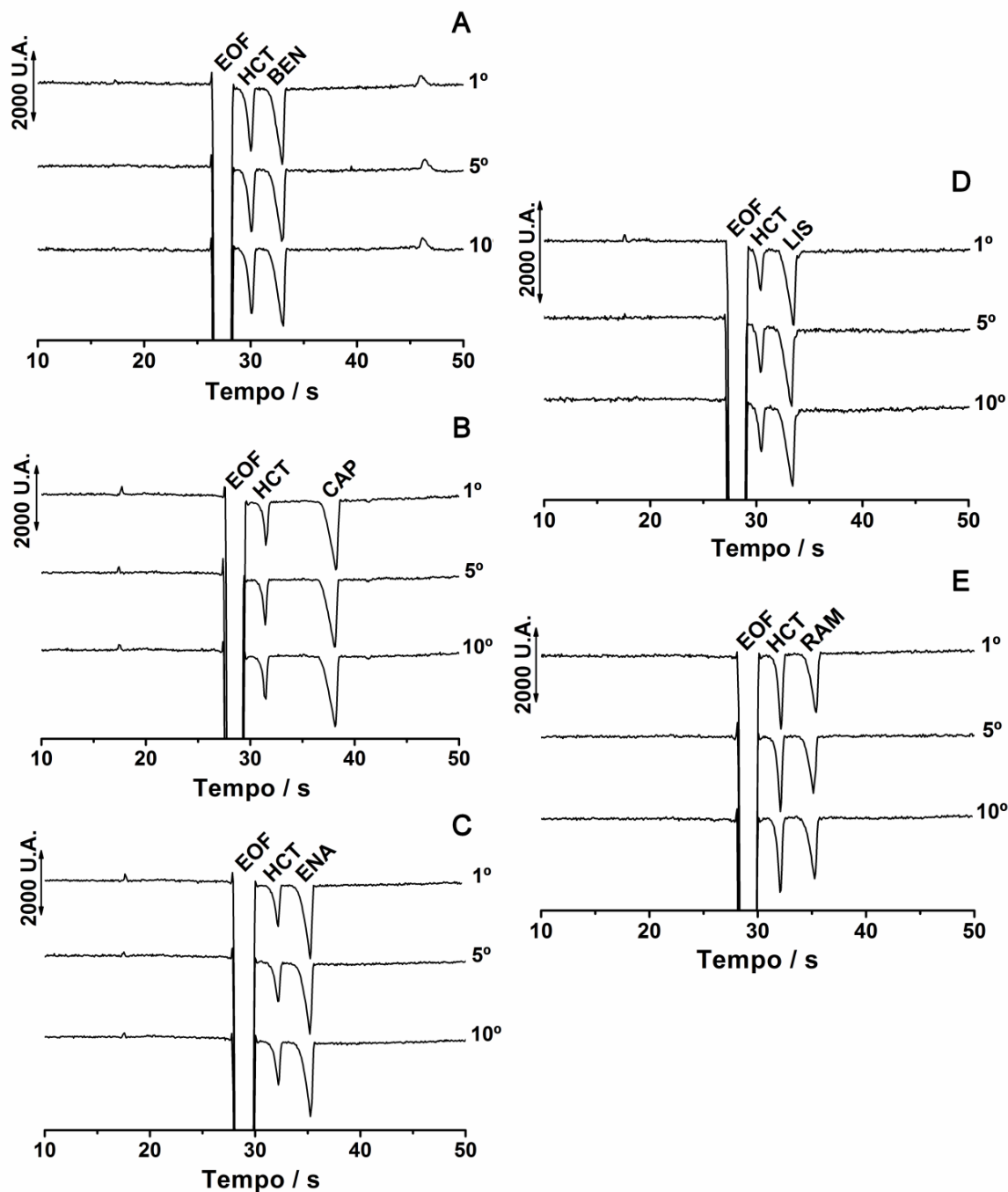


Figura 43. Eletroferogramas obtidos no estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas de soluções padrão composta por: (A) HCT ($225 \mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) HCT ($150 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA ($125 \mu\text{mol L}^{-1}$); (D) HCT ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (E) HCT ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM ($84 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições ver figura 35.



O método proposto para determinação de HCT na presença de outros fármacos exibiu adequada precisão de injeção com desvios padrões relativos inferiores a 1,7% e 4% em relação ao

tempo de migração e área dos picos, respectivamente. Embora o estudo de repetibilidade de injeção tenha sido realizado com dez injeções sucessivas de uma mesma solução padrão, observou-se que respostas similares e estáveis ocorriam até cerca de 20 injeções sucessivas usando o mesmo BGE. Após essas 20 injeções, foram observadas algumas mudanças nos tempos de migração das espécies envolvidas, mas essa limitação era facilmente contornada com a substituição do BGE no interior do capilar ao se realizar o procedimento de “*flush*” (injeção de BGE por 3 minutos) restaurando as condições iniciais e ideais para a análise. Informações mais detalhadas sobre as características analíticas do método proposto são apresentadas na Tabela 17.

Os LODs foram estimados por via experimental, sem uso de cálculos, aferindo o sinal analítico de soluções progressivamente menos concentradas e também são apresentados junto a outros dados na Tabela 17. É preciso salientar que os LODs e, conseqüentemente, os LOQs obtidos por CE-C⁴D são maiores do que os encontrados na literatura para HPLC. No entanto, um elevado valor de LOQ não causa uma limitação no método proposto, quando se tem como objetivo a determinação do princípio ativo em amostras farmacêuticas, nas quais o princípio ativo se encontra, geralmente, em concentrações elevadas. Essa desvantagem se mostra como uma limitação pelo fato da detecção C⁴D não poder ser aplicada em amostras quando em busca de traços dos analitos, e nem mesmo em amostras biológicas, sem antes se realizar um processo de “*clean-up*” ou uma pré-concentração.

Tabela 17. Características analíticas do método proposto (valor \pm SD).

	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD (mg L^{-1})	r	Inclinação (b)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	RSD (%; n=10)	Resolução	Tempo de migração (s)	Frequência analítica (h^{-1})
HCT	10	3,0	0,999	0,0783	50 - 300	2,5	2,1 \pm 0,1	32,4 \pm 0,2	111
ATE	3	0,8	0,999	0,2229	100 - 600	2,6	2,2 \pm 0,1	24,4 \pm 0,2	
HCT	10	3,0	0,998	0,0678	50 - 200	4,0	2,2 \pm 0,1	30,8 \pm 0,4	117
MET	4	1,1	0,999	0,1627	230 - 910	2,7	1,8 \pm 0,1	23,7 \pm 0,4	
HCT	10	3,0	0,999	0,0707	50 - 250	3,6	2,0 \pm 0,1	31,3 \pm 0,1	115
PRO	5	1,3	0,996	0,1935	100 - 500	2,2	1,8 \pm 0,1	24,4 \pm 0,1	
HCT	10	3,0	0,997	0,0643	50 - 300	3,3	1,7 \pm 0,1	30,9 \pm 0,1	102
LOS	3	1,3	0,999	0,2040	130 - 780	0,5	2,4 \pm 0,1	35,2 \pm 0,1	
HCT	10	3,0	0,998	0,0611	50 - 400	2,9	1,4 \pm 0,1	31,3 \pm 0,1	85
VAL	14	6,1	0,998	0,0673	218 - 1740	2,2	3,3 \pm 0,1	42,2 \pm 0,1	
HCT	10	3,0	0,999	0,0720	75 - 750	2,5	1,3 \pm 0,1	30,2 \pm 0,1	109
BEN	5	2,1	0,996	0,1795	50 - 500	2,2	1,5 \pm 0,1	33,1 \pm 0,1	
HCT	10	3,0	0,999	0,0670	100 - 500	3,2	1,3 \pm 0,1	31,3 \pm 0,1	95
CAP	7	1,5	0,998	0,1341	200 - 1000	2,1	4,0 \pm 0,2	37,9 \pm 0,1	
HCT	10	3,0	0,999	0,0682	50 - 500	2,5	1,8 \pm 0,1	32,3 \pm 0,1	102
ENA	5	1,9	0,998	0,1765	63 - 625	2,7	2,5 \pm 0,1	35,3 \pm 0,2	
HCT	10	3,0	0,996	0,0687	50 - 500	3,7	1,8 \pm 0,1	30,5 \pm 0,1	108
LIS	5	2,0	0,995	0,2090	50 - 500	2,4	1,7 \pm 0,1	33,3 \pm 0,1	
HCT	10	3,0	0,999	0,0732	150 - 800	3,8	1,7 \pm 0,1	32,1 \pm 0,1	102
RAM	6	2,5	0,997	0,2147	50 - 267	3,4	2,3 \pm 0,1	35,2 \pm 0,1	

*Calculado entre o pico do analito e o pico anterior. Exceto para ATE, MET e PRO (calculado entre o pico do analito e o EOF).

Posteriormente, as faixas lineares de resposta dos analitos em estudo foram avaliadas. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção ($n = 3$) de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT+ATE (Figura 44), HCT+MET (Figura 45), HCT+PRO (Figura 46), HCT+KLOS (Figura 47), HCT+VAL (Figura 48), HCT+BEN (Figura 49), HCT+CAP (Figura 50), HCT+ENA (Figura 51), HCT+LIS (Figura 52) e HCT+RAM (Figura 53), e suas respectivas curvas de calibração são apresentados a seguir. Os resultados obtidos neste estudo foram apresentados anteriormente na Tabela 17. Nota-se que neste trabalho não foi feito um estudo de linearidade convencional, ou seja, não se sabe até qual concentração dos analitos o método ainda é linear (limite de linearidade). No entanto, a faixa estudada é suficiente para a determinação de fármacos e nesse caso a diferença de concentração dos analitos em uma mesma formulação foi observada. Segundo a ANVISA, deve ser considerada uma faixa de trabalho de 80% a 120% da concentração esperada para o analito [174].

Figura 44. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de ATE (100-600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver Figura 35.

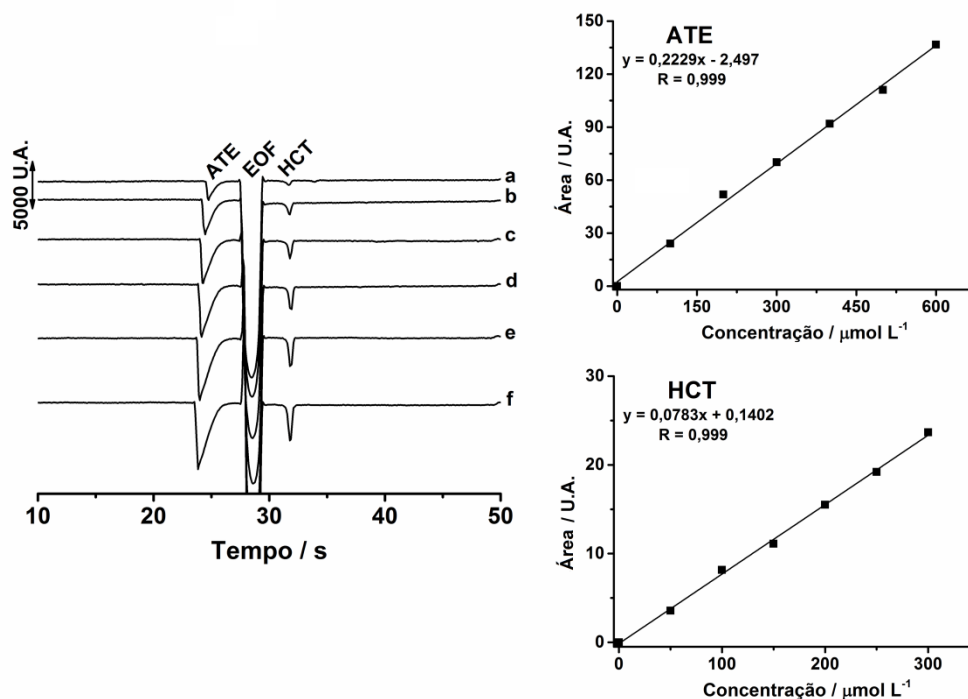


Figura 45. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de MET (88-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

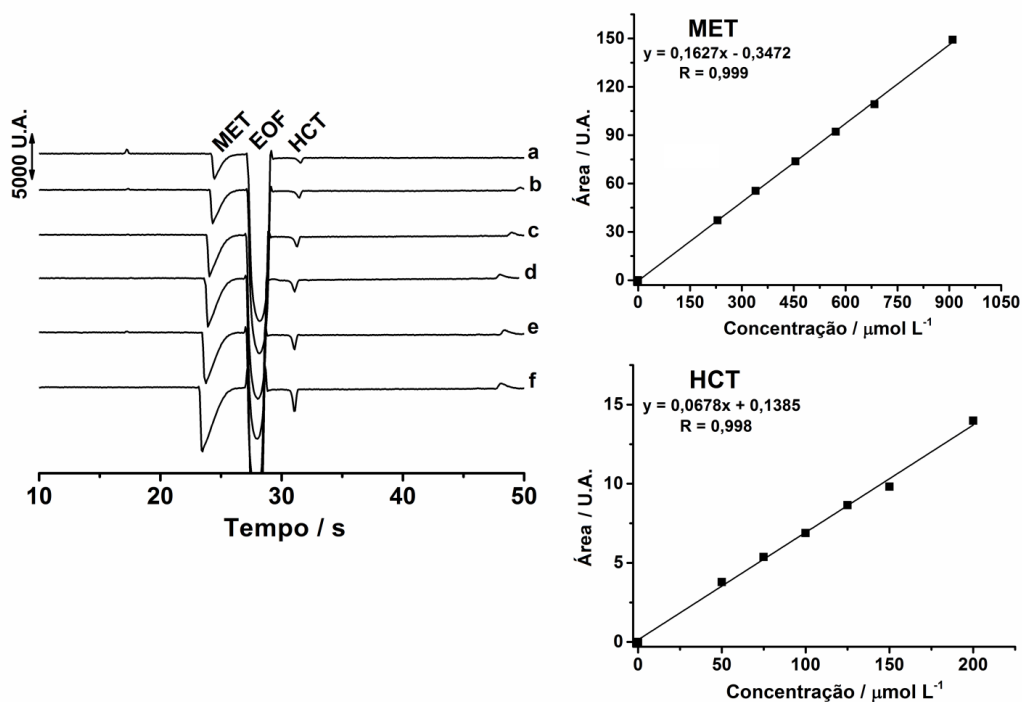


Figura 46. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de PRO (100-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

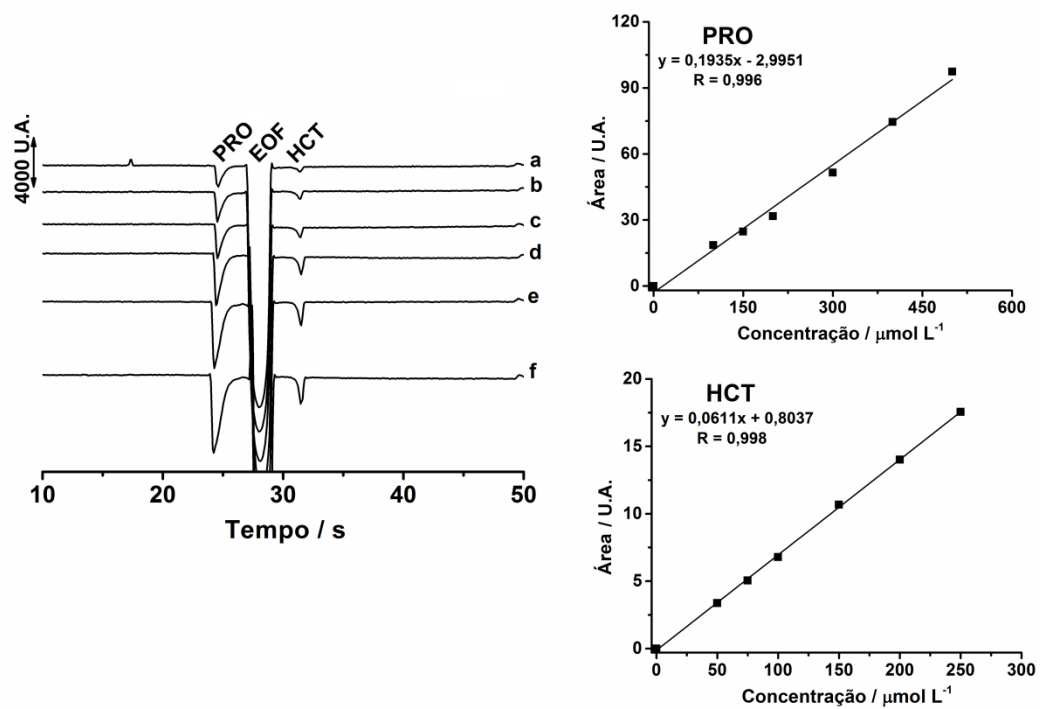


Figura 47. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de KLOS (130-780 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e HCT (50-300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

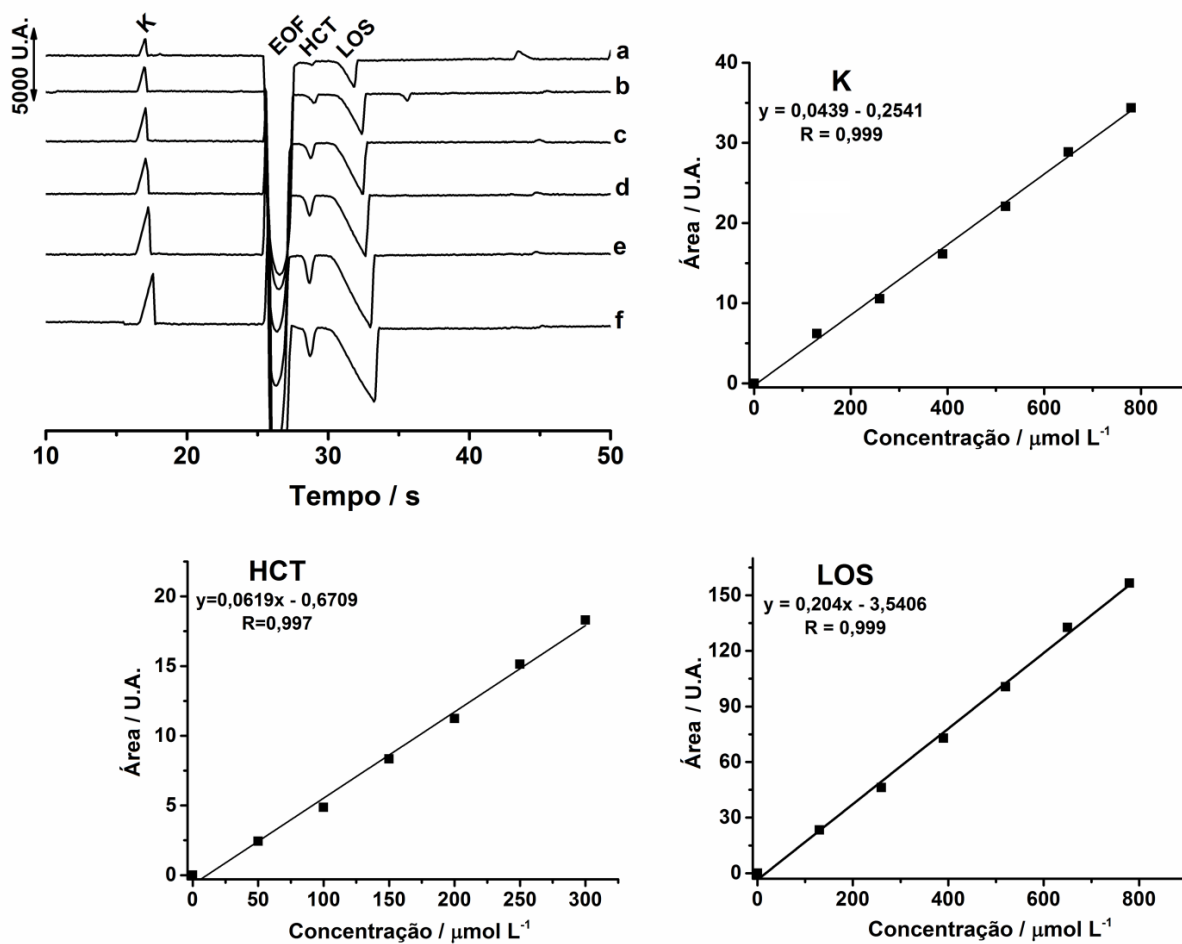


Figura 48. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (50-400 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e VAL (218-1740 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

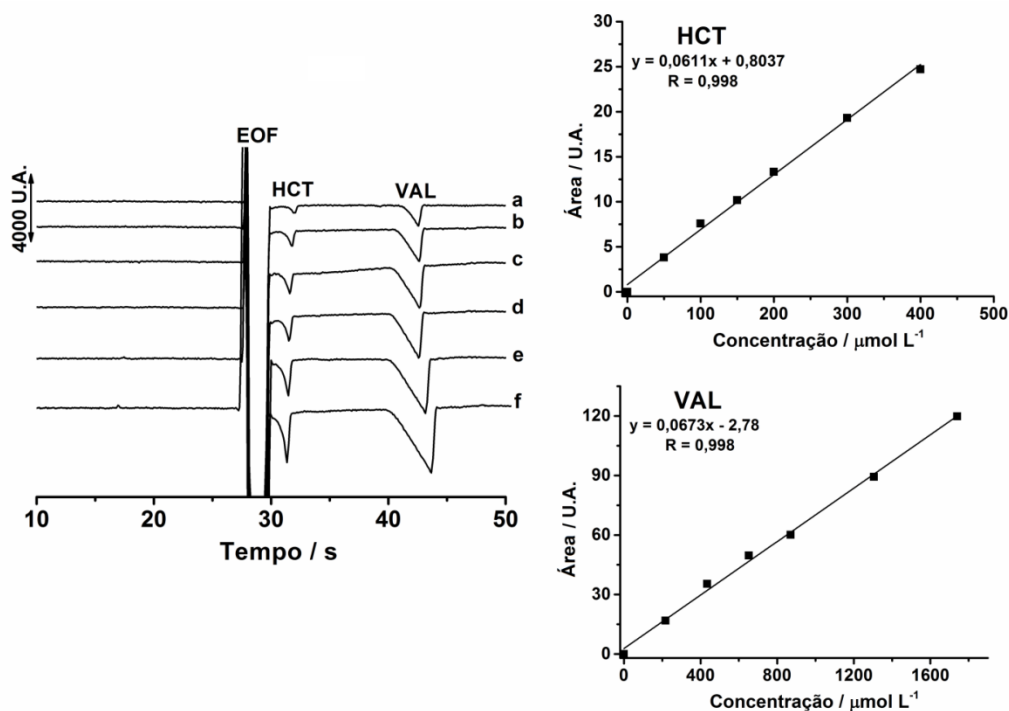


Figura 49. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (75-750 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e BEN (50-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

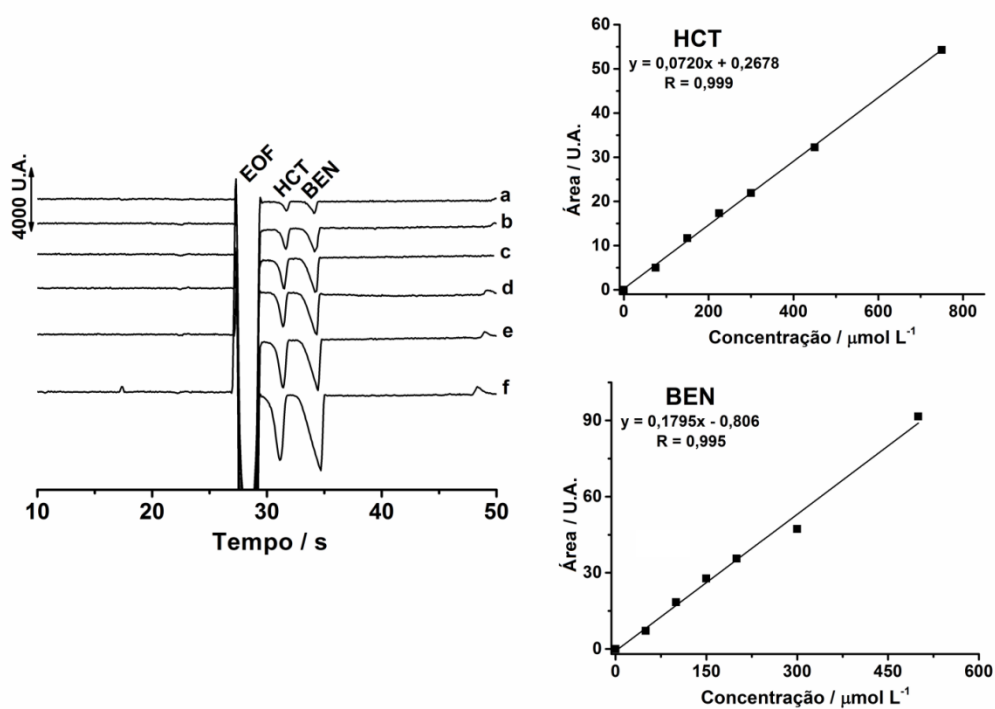


Figura 50. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (100-500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e CAP (200-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

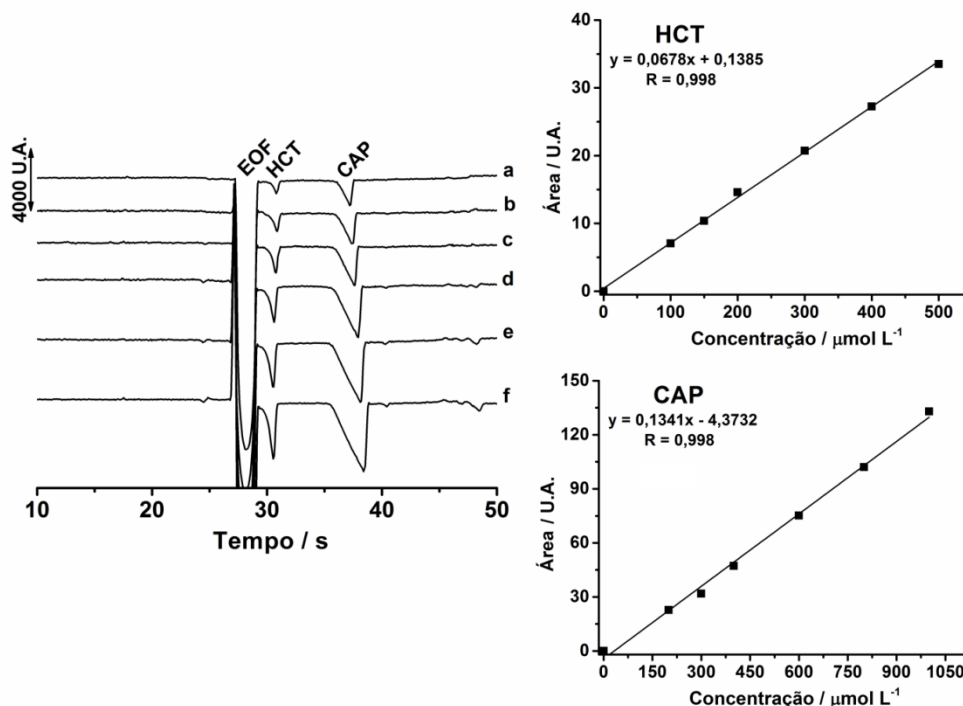


Figura 51. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT (50-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ENA (63-1250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

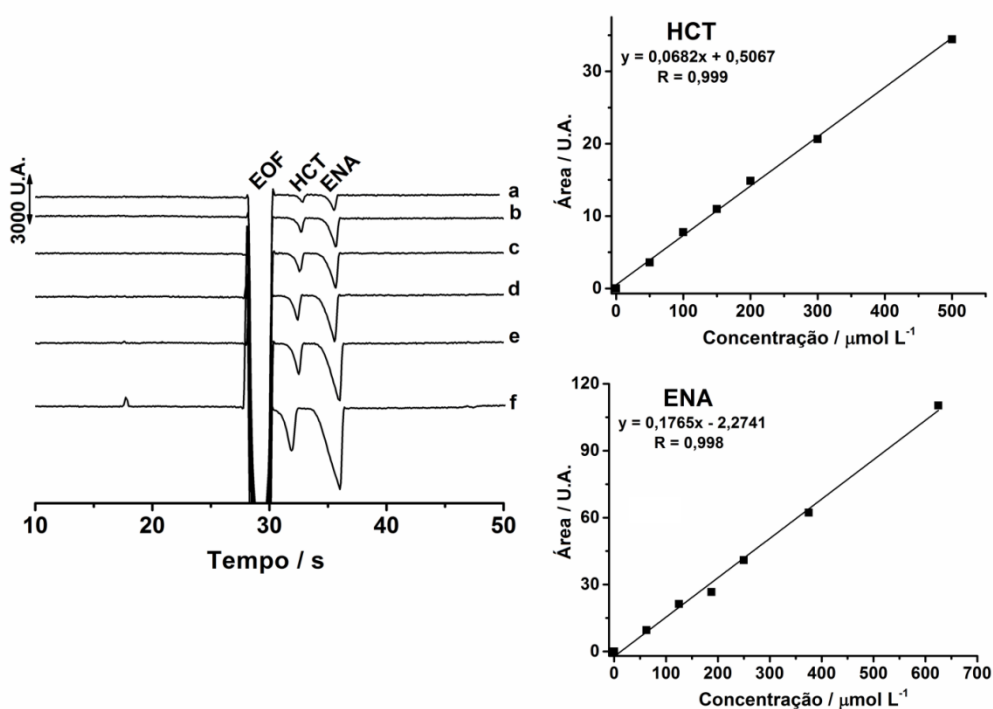


Figura 52. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT ($50-500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e LIS ($50-500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.

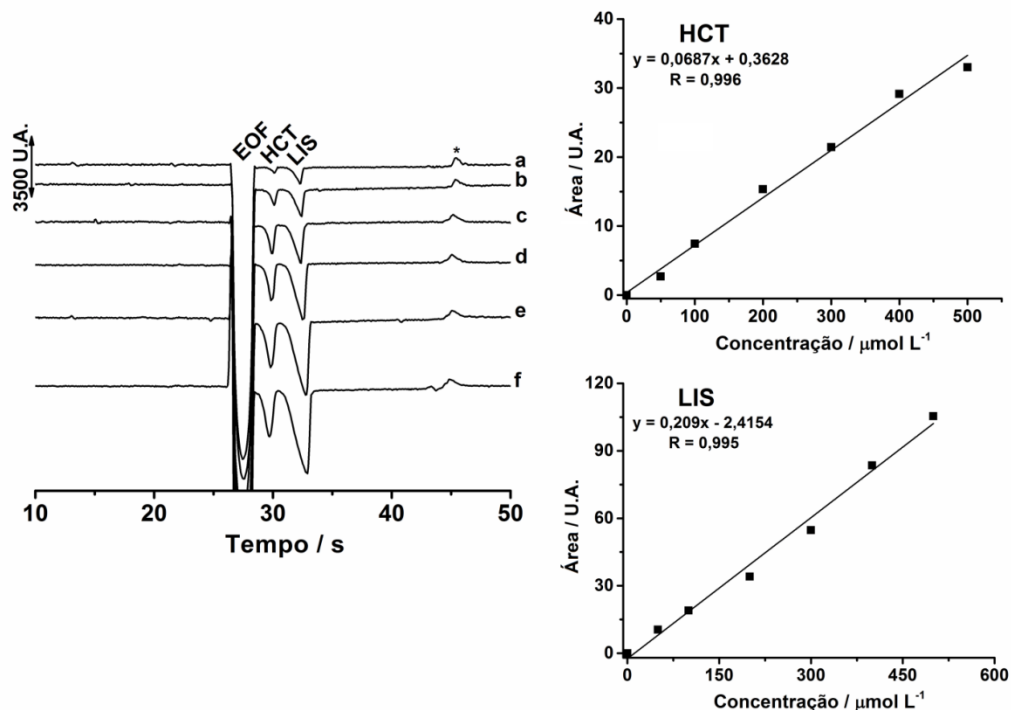
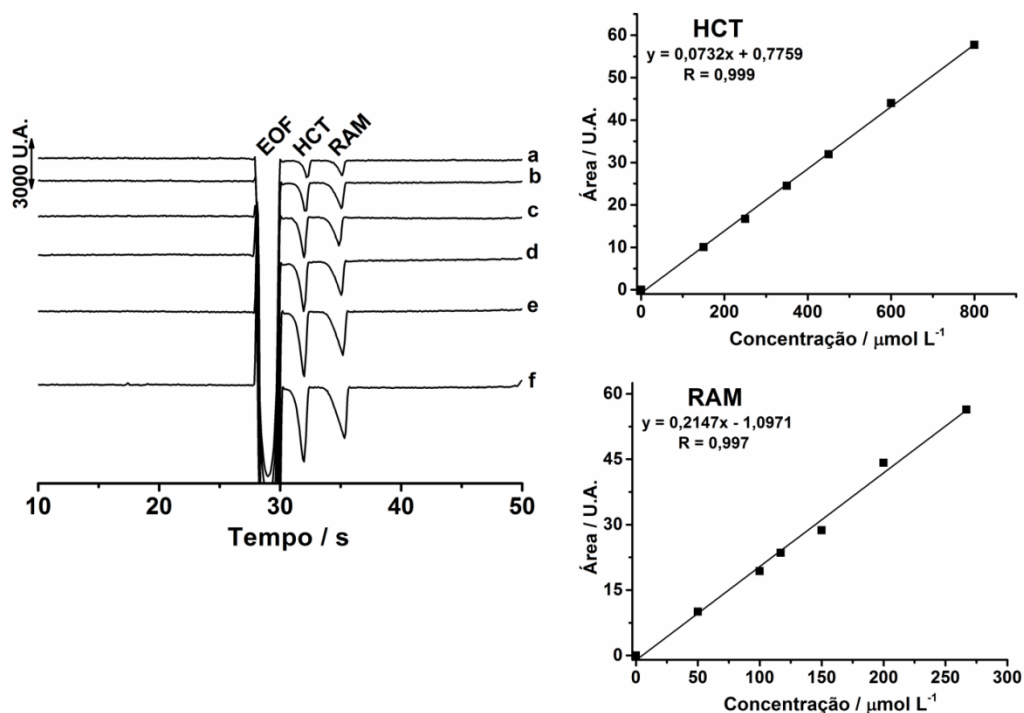


Figura 53. Eletroferogramas de soluções padrão contendo concentrações crescentes de HCT ($150-800 \mu\text{mol L}^{-1}$) e RAM ($50-267 \mu\text{mol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições ver figura 35.



Como pode ser visualizado nas Figuras 44 a 53 e na Tabela 17, as curvas de calibração para os analitos de interesse apresentaram boa linearidade, resultando em valores satisfatórios de coeficientes de correlação ($r > 0,995$). Nota-se que, quando os slopes obtidos nas equações das retas da HCT na presença de diferentes princípios ativos são comparados estatisticamente, estes apresentaram RSD igual a 6%. Isto indica que o método proposto apresenta uma boa precisão inter-dias, ou ainda que o sinal apresentado pela HCT sofre baixa influência dos outros analitos.

A tabela 18 mostra os resultados obtidos para a análise de 10 formulações farmacêuticas contendo HCT na presença de outros princípios ativos.

Tabela 18. Resultados obtidos na determinação de HCT na presença de outros princípios ativos via CE-C⁴D versus valores encontrados na bula das formulações farmacêuticas (valor ± SD).

Amostra	Analitos	Bula (mg/comprimido)	CE-C⁴D (mg/comprimido)	Erro relativo (%)
1	HCT	12,5	12,0 ± 0,4	- 4,0
	ATE	100	99,3 ± 1,0	- 0,7
2	HCT	12,5	11,8 ± 0,2	- 5,6
	MET	100	99,3 ± 0,4	- 0,7
3	HCT	25	25,6 ± 1,6	+ 2,4
	PRO	40	42,5 ± 0,4	+ 6,3
4	HCT	12,5	13,0 ± 0,1	+ 3,7
	LOS	45,8	44,1 ± 0,6	- 3,6
5	HCT	12,5	11,8 ± 0,1	- 5,6
	VAL	160	175,6 ± 2,2	+ 9,8
6	HCT	6,3	5,8 ± 0,1	- 7,9
	BEN	5	5,2 ± 0,1	+ 4,0
7	HCT	25	24,1 ± 0,1	- 3,6
	CAP	50	47,6 ± 0,3	- 4,8
8	HCT	12,5	12,5 ± 0,4	0
	ENA	20	19,3 ± 0,7	- 3,5
9	HCT	12,5	13,3 ± 0,3	+ 6,4
	LIS	20	13,1 ± 0,3	- 34,5
10	HCT	12,5	13,2 ± 0,1	+ 5,6
	RAM	5	4,6 ± 0,1	- 8,0

Diferença: [(Valores encontrado na bula) – (Valores obtidos pelo método proposto)] / Valores encontrado na bula

x100

Pode-se observar que os resultados obtidos pelo método proposto (CE-C⁴D) são similares aos encontrados na bula, exceto para LIS, demonstrando que o método é capaz de fazer a determinação dos fármacos de interesse em formulações farmacêuticas comerciais. Devido à dificuldade de encontrar uma amostra comercial contendo HCT+LIS, esta foi manipulada em uma farmácia de manipulação local. O resultado discrepante para LIS pode ser devido à algum erro durante o processo de manipulação do mesmo.

A exatidão do método foi avaliada através da análise de amostras farmacêuticas reais e mediante estudos de adição e recuperação. Amostras foram adequadamente preparadas para serem analisadas antes e após adição de uma concentração conhecida de cada analito. Como pode ser observado na tabela 19, os estudos de adição e recuperação apresentaram resultados com recuperações entre 92 e 106% para todos os analitos indicando a ausência de efeito matriz. É importante ressaltar que a segundo a ANVISA os intervalos aceitáveis geralmente estão entre 70 e 120% [174].

Tabela 19. Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (valor \pm SD; n = 3).

Amostra	Analitos	Analísada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	HCT	96 \pm 3	100	208 \pm 7	106 \pm 3
	ATE	219 \pm 2	200	389 \pm 4	93 \pm 2
2	HCT	71 \pm 1	50	111 \pm 2	92 \pm 2
	MET	260 \pm 1	50	322 \pm 1	104 \pm 3
3	HCT	102 \pm 6	100	204 \pm 12	101 \pm 4
	PRO	191 \pm 2	200	383 \pm 4	98 \pm 3
4	HCT	207 \pm 2	50	262 \pm 2	102 \pm 4
	LOS	443 \pm 6	130	579 \pm 8	101 \pm 2
5	HCT	94,4 \pm 1	100	204 \pm 2	105 \pm 2
	VAL	955 \pm 12	435	1445 \pm 18	104 \pm 3
6	HCT	138 \pm 2	150	274 \pm 5	95 \pm 3
	BEN	86 \pm 2	100	175 \pm 3	94 \pm 2
7	HCT	193 \pm 1	100	287 \pm 1	98 \pm 3
	CAP	514 \pm 3	100	589 \pm 4	96 \pm 4
8	HCT	150 \pm 5	150,0	291 \pm 9	97 \pm 2
	ENA	182 \pm 7	187,5	373 \pm 14	101 \pm 5
9	HCT	106 \pm 2	50	164 \pm 4	105 \pm 2
	LIS	78,6 \pm 2	50	135 \pm 3	105 \pm 3
10	HCT	370 \pm 3	100	498 \pm 4	106 \pm 3
	RAM	92 \pm 2	150	242 \pm 5	100 \pm 4

4.3.1. Conclusões parciais

O método proposto permite a determinação rápida e simultânea de HCT na presença de ATE, MET, PRO, KLOS, VAL, BEN, CAP, ENA, LIS ou RAM, em formulações farmacêuticas pois fornece limites de detecção, robustez, seletividade, precisão e exatidão adequados para esta finalidade. Concordantes com esta afirmação estão os resultados obtidos pelos testes de adição e recuperação, os quais podem ser considerados satisfatórios (entre 92 e 106 %). As etapas de preparo de amostra são simples (diluição e filtração), sem etapas prévias de extração ou derivatização, e sem se fazer necessário o uso de padrão interno (normalmente requisitado em análises por CE). O método analítico possui uma boa frequência analítica (> 85 injeções h^{-1}) sendo assim apropriado para análises rotineiras. Além disso o método proposto tem uma geração mínima de resíduos por causa do baixo volume de amostras e reagentes gastos por análise, resultando em menor impacto ambiental.

5. Conclusões gerais e perspectivas

No presente trabalho, a técnica de CE-C⁴D foi utilizada para o desenvolvimento de métodos rápidos para determinação simultânea dos seguintes princípios ativos presentes em formulações farmacêuticas:

- Amoxicilina, clavulanato e potássio;
- Hidroclorotiazida, losartana e potássio;
- Hidroclorotiazida e atenolol;
- Hidroclorotiazida e metoprolol;
- Hidroclorotiazida e propranolol;
- Hidroclorotiazida e valsartana;
- Hidroclorotiazida e benazepril;
- Hidroclorotiazida e captopril;
- Hidroclorotiazida e enalapril;
- Hidroclorotiazida e lisinopril;
- Hidroclorotiazida e ramipril.

Os métodos desenvolvidos neste trabalho são simples, rápidos e de baixo custo (equipamento e manutenção) e utilizou um equipamento construído em laboratório. Além disso, possui baixo consumo de reagentes e amostras gerando menores impactos ambientais. Assim, pode-se afirmar que estes métodos apresentam significativas vantagens em relação ao uso de HPLC que é a principal técnica utilizada no controle de qualidade de formulações farmacêuticas. Os resultados obtidos com o sistema CE-C⁴D foram estatisticamente similares aos obtidos por HPLC e fotometria de chama (nível de confiança de 95%) e apresentaram resultados satisfatórios

nos testes de recuperação (92% a 106%), o que confirma a exatidão do método. A determinação simultânea de um íon metálico (K) e de uma molécula orgânica (AMX ou LOS) pode ser considerado outra vantagem do sistema CE-C⁴D, sendo possível fazer a análise estequiométrica destes compostos. A determinação da estequiometria do sal pode trazer indícios da presença de impurezas na formulação farmacêutica ou também sobre a existência de processos de degradação/hidrólise do princípio ativo.

Os métodos também possuem algumas desvantagens como a limitação na análise de amostras mais complexas (amostras biológicas), devido ao fato do C⁴D ser um detector universal (detecção de uma enorme quantidade de compostos).

Como perspectivas futuras, possivelmente em um pós-doutorado, o interesse é no desenvolvimento de novos métodos rápidos com o intuito de ampliar a aplicabilidade de sistemas de CE-C⁴D. O foco poderá ser direcionado para amostras com matrizes mais complexas (amostras biológicas) que necessitam de extração como etapa prévia (“cleanup”).

6. Referências Bibliográficas

- [1] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, 27 (2004) 771–780.
- [2] The United States Pharmacopeia. Disponível em: <<http://www.usp.org/usp-brazil>>. Acessado às 16:30h de 10/01/2018.
- [3] M.C.G. Santos, C.R.T. Tarley, L.H. Dall'Antonia, E.R. Sartori, Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations, Sens. Actuators B Chem. 188 (2013) 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.025>
- [4] L.A. Basaez, I.M. Peric, P.A. Jara, C.A. Soto, D.R. Contreras, C. Aguirre, P. Vanysek, Electrochemical and electrophoretic study of sodium metamizole, J. Chil. Chem. Soc. 53 (2008) 1572–1575. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072008000300004>
- [5] R.B. Raffa RB, D.J. Jr. Stone, R.J. Tallarida, Discovery of “self-synergistic” spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol), J. Pharmacol. Exp. Ther. 295 (2000) 291–294.
- [6] K.H. Yoon, S.Y. Lee, W. Kim, J.S. Park, H.J. Kim, Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC-ESI mass spectrometry, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 813 (2004) 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.018>
- [7] Site da internet disponível em: <<https://chemicalize.com/#calculation>>. Acessado às 21:40 de 22/02/2018.
- [8] J.A.J. Kosmidis, D. Willians, Amoxicillin-pharmacology, bacteriology and clinical studies, Br. J. Clin. Pract. 26 (1972) 341–346.
- [9] F. Hasanpour, A.A. Ensafi, T. Khayamian, Simultaneous chemiluminescence determination of amoxicillin and clavulanic acid using least squares support vector regression, Anal. Chim. Acta. 670 (2010) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.001>

- [10] V.T. Huong, V.D. Hoang, Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanate in combined tablets by non-derivative and derivative UV spectrophotometric techniques, *Int. J. PharmTech Res.* 1 (2009) 1173–1181.
- [11] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, Development of a validated HPLC method for the determination of four penicillin antibiotics in pharmaceuticals and human biological fluids, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1550–1560. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600081>
- [12] A. Aghazadeh, G. Kazemifard, Simultaneous determination of amoxycillin and clavulanic acid in pharmaceutical dosage forms by LC with amperometric detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 325–329. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00507-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00507-0)
- [13] S. Joshi, HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 795–809. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00706-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00706-3)
- [14] M.A. Abounassif, E.M. Abdel-Moety, M.E. Mohamed, E.R.A. Gad-Kariem, Liquid chromatographic determination of amoxycillin and clavulanic acid in pharmaceutical preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 731–735. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(91\)80214-T](https://doi.org/10.1016/0731-7085(91)80214-T)
- [15] A. Özdemir, A. Korkmaz, Comparative study of electrospray mass spectrometry and first derivative method and validation by HPLC method, *J. Food Drug Anal.* 15 (2007) 118–125.
- [16] G. Indrayanto, T.K. Sa, S. Widjaja, Simultaneous determination of amoxycillin trihydrate and clavulanate potassium in pharmaceutical preparations by thin-layer chromatography/densitometry, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 1493–1496.
- [17] G. Pajchel, K. Pawłowski, S. Tyski, CE versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 75–81. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00029-8)
- [18] G. Hancu, A. Neacșu, L.A. Papp, A. Ciurba, Simultaneous determination of amoxicillin and

- clavulanic acid in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 52 (2016) 281–286. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502016000200006>
- [19] Y. Liu, K. Zhu, J. Wang, X. Huang, G. Wang, C. Li, J. Cao, S. Ding, Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone in cows' milk by UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1008 (2016) 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.031>
- [20] A.L.H. Müller, É.M.M. Flores, E.I. Müller, F.E.B. Silva, M.F. Ferrão, Attenuated total reflectance with Fourier transform infrared spectroscopy (ATR/FTIR) and different PLS algorithms for simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in powder pharmaceutical formulation, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (2011) 1903–1912. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001000011>
- [21] H.A. El-Obeid, E.A. Gad-Kariem, K.A. Al-Rashood, H.A. Al-Khamees, F.S. El-Shafie, G.A.M. Bawazeer, A selective colorimetric method for the determination of penicillins and cephalosporins with α -aminoacyl functions, *Anal. Lett.* 32 (1999) 2809–2823. <https://doi.org/10.1080/00032719908543008>
- [22] A. Pasamontes, M.P. Callao, Sequential injection analysis for the simultaneous determination of clavulanic acid and amoxicillin in pharmaceuticals using second-order calibration, *Anal. Sci.* 22 (2006) 131–135. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.131>
- [23] E.Vranic, M.C. Icardo, J.M. Calatayud, Three simultaneous dissolution profiles on a solid pharmaceutical formulation by a FIA manifold provided with a single spectrophotometric detector, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.japna.2003.07.007>
- [24] A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, A sequential injection analysis system for potassium clavulanate determination using two potentiometric detectors, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 931–937. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00474-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00474-0)
- [25] A.M. De La Peña, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Espinosa-Mansilla, R. Sánchez-Maqueda,

- Stopped-flow fluorimetric determination of amoxicillin and clavulanic acid by partial least-squares multivariate calibration, *Talanta*. 56 (2002) 635–642. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00612-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00612-9)
- [26] P. Izquierdo, A. Gomex-Hens, D. Perez-Bendito, Simultaneous kinetic fluorimetric determination of amoxicillin and clavulanic acid by the stopped-flow mixing technique, *Analyst* 118 (1993) 707–710. <https://doi.org/10.1039/AN9931800707>
- [27] Antagonistas dos receptores da angiotensina II: umarevisão de classe. *Revista Saúde e Desenvolvimento*. Disponível em: <<https://www.uninter.com/revistasaude/index.php/saudeDesenvolvimento/article/viewFile/129/64>>. Acessado às 14h de 04/01/2018.
- [28] D.L. Hertzog, J.F. McCafferty, X. Fang, R.J. Tyrrell, R. a Reed, Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of Losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 747–760. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00385-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00385-0)
- [29] A.R. Tengli, B.M. Gurupadayya, N. Soni, Simultaneous estimation of hydrochlorothiazide, amlodipine, and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC, *Int. J. Chem. Anal. Sci.* 4 (2013) 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijcas.2013.03.003>
- [30] G. Carlucci, G. Palumbo, P. Mazzeo, M. G. Quaglia, Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biom. Anal.* 23 (2000) 185–189. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00268-5)
- [31] N. Erk, Analysis of binary mixtures of losartan potassium and hydrochlorothiazide by using high performance liquid chromatography, ratio derivative spectrophotometric and compensation technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 603–611. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00434-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00434-9)
- [32] M.G. Quaglia, E. Donati, G. Carlucci, P. Mazzeo, S. Fanali, Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 981–

987. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00138-3)
- [33] S. Hillaert, W. Van Den Bossche, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin-II-receptor antagonists by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00643-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00643-X)
- [34] C.V.N. Prasad, C. Parihar, T. Rama Chowdhary, S. Purohit, P. Parimoo, Simultaneous determination of atenolol-amlodipine and haloperidol-trihexyphenidyl in combined tablet preparations by derivative spectroscopy, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 4 (1998) 325–330.
- [35] D.T. Gimenes, M.C. Marra, R.A. Abarza Muñoz, L. Angnes, E.M. Richter, Determination of propranolol and hydrochlorothiazide by batch injection analysis with amperometric detection and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Anal. Methods.* 6 (2014) 3261–3267. <https://doi.org/10.1039/C4AY00272E>
- [36] C.A.R. Salamanca-Neto, A.P.P. Eisele, V.G. Resta, J. Scremin, E.R. Sartori, Differential pulse voltammetric method for the individual and simultaneous determination of antihypertensive drug metoprolol and its association with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms, *Sensors Actuators, B Chem.* 230 (2016) 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.071>
- [37] M.C.F. Ferraro, P.M. Castellano, T.S. Kaufman, Chemometric determination of amiloride hydrochloride, atenolol, hydrochlorothiazide and timolol maleate in synthetic mixtures and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 305–314. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00521-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00521-1)
- [38] P. Ravisankar, G. Devala Rao, M. Krishna Chaitanya, C.H. Devadasu, P. Srinivasa Babu, Rapid separation of five anti-hypertensive agents-atenolol, metoprolol, hydrochlorothiazide, amlodipine and nebivolol: Application to estimation of metoprolol succinate in tablet dosage form, *J. Chem. Pharm. Res.* 5 (2013) 215–228.
- [39] S.R. Sathe, S.B. Bari, Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin-layer chromatography

- with UV absorption densitometry., *Acta Chromatogr.* 19 (2007) 270–278.
- [40] D. Durga Rao, N. V. Satyanarayana, S.S. Sait, Y. Ramakoti Reddy, K. Mukkanti, Simultaneous Determination of Losartan Potassium, Atenolol and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations by Stability-Indicating UPLC, *Chromatographia* 70 (2009) 647–651. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1221-x>
- [41] A.K. Behera, Simultaneous spectrophotometric estimation of atenolol and hydrochlorothiazide in tablet dosage forms, *Int. J. ChemTech Res.* 2 (2010) 1901–1906.
- [42] S.S. Yadav, J.R. Rao, Micellar liquid chromatographic analysis for simultaneous determination of atenolol and hydrochlorothiazide in tablet dosage form, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5 (2013) 63–67.
- [43] S. V. Erram, H.P. Tipnis, Simple spectrometric analysis of acebutolol hydrochloride and atenolol in combined pharmaceutical dosages with hydrochlorothiazide, *Indian Drugs* 30 (1993) 462–467.
- [44] S.S. Yadav, J.R. Rao, RP-HPLC method for simultaneous estimation of Aspirin, Ramipril, hydrochlorothiazide, simvastatin and atenolol from pharmaceutical dosage form, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (2014) 443–448.
- [45] G. Garg, S. Saraf, S. Saraf, New spectrophotometric methods for the determination of atenolol and hydrochlorothiazide in combined dosage forms, *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* 3 (2006) 389–392.
- [46] K.N. Tarkase, S.A. Hapse, A.S. Shirsath, P.T. Kadaskar, Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous estimation of atenolol and hydrochlorothiazide in pure and tablet dosage form, *Int. J. ChemTech Res.* 4 (2012) 1146–1150.
- [47] A.B. Thomas, U.B. Chavan, R.K. Nanda, L.P. Kothapalli, S.N. Jagdale, S.B. Dighe, A.D. Deshpande, Simultaneous RP-HPLC analysis of atenolol, hydrochlorothiazide, and losartan potassium in a tablet formulation., *Acta Chromatogr.* 22 (2010) 219–226.

<https://doi.org/10.1556/AChrom.22.2010.2.5>

- [48] S. Bari, S. Sathe, P. Jain, S. Surana, Spectrophotometric method for simultaneous estimation of atenolol in combination with losartan potassium and hydrochlorothiazide in bulk and tablet formulation, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2 (2010) 372–5. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72144>
- [49] S. Saraf, S. Saraf, G. Garg, New procedure for the determination of atenolol and hydrochlorothiazide by spectrophotometry, HPLC and HPTLC in combined dosage forms, *Indian Pat. Appl.* 2008.
- [50] S. Brijesh, D.K. Patel, S.K. Ghosh, Development of reverse-phase HPLC method for simultaneous analysis of metoprolol succinate and hydrochlorothiazide in a tablet formulation, *Trop. J. Pharm. Res.* 8 (2009) 539–543.
- [51] M. Stolarczyk, R. Ekiert, J. Krzek, W. Rzeszutko, Determination of metoprolol and hydrochlorothiazide by derivative spectrophotometric method in pharmaceutical preparations, *Acta Pol. Pharm. Drug Res.* 63 (2006) 169–173.
- [52] N. Rawool, a Venkatchalam, Analytical method for the simultaneous estimation of hydrochlorothiazide and metoprolol tartrate using RP HPLC, *Indian J. Pharm. Sci.* 73 (2011) 219. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.91565>
- [53] A.S. Patil, S.S. Sait, A. Deshamukh, G. Deshpande, An improved validated HPLC method for separation of metoprolol and hydrochlorothiazide impurities in metoprolol and hydrochlorothiazide tablets, *Der Pharm. Lett.* 7 (2015) 183–190.
- [54] A.R. Rote, P.R. Sonavane, Bioanalytical method development and validation for determination of metoprolol tartarate and hydrochlorothiazide using HPTLC in human plasma, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 845–851. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000400025>
- [55] F. Gao, M. Zhang, X. Cui, Z. Wang, Y. Sun, J. Gu, Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and metoprolol in human plasma by liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 149–154.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.12.012>
- [56] S. V. Erram, H.P. Tipnis, Simple spectrometric analysis of propranolol hydrochloride and hydrochlorothiazide from combined pharmaceutical dosages, *Indian Drugs*. 31 (1994) 65–68.
- [57] S.K. Jain, D. Jain, M. Tiwari, S.C. Chaturvedi, Simultaneous spectrophotometric determination of propranolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations, *Indian J. Pharm. Sci.* 64 (2002) 267–270.
- [58] C.V.N. Prasad, V. Bharadwaj, V. Narsimhan, R.T. Chowdhary, P. Parimoo, Simultaneous Determination of Metoprolol-Hydrochlorothiazide and Propranolol-Hydrochlorothiazide in Combined Formulations by Derivative Spectroscopy, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 325–330.
- [59] B.C. Lourencao, T.A. Silva, O. Fatibello-Filho, G.M. Swain, Voltammetric Studies of Propranolol and Hydrochlorothiazide Oxidation in Standard and Synthetic Biological Fluids Using a Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon (ta-C:N) Electrode, *Electrochim. Acta.* 143 (2014) 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.08.008>
- [60] A. Jonczyk, Z. Nowakowska, Determination of hydrochlorothiazide, triamterene and propranolol hydrochloride by spectrophotometric method and high-performance liquid chromatography (HPLC), *Acta Pol. Pharm.* 58 (2001) 339–344.
- [61] I.A. Naguib, E.A. Abdelaleem, M.E. Draz, H.E. Zaazaa, Linear support vector regression and partial least squares chemometric models for determination of Hydrochlorothiazide and Benazepril hydrochloride in presence of related impurities: A comparative study, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 130 (2014) 350–356.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.024>
- [62] T. Huang, Z. He, B. Yang, L. Shao, X. Zheng, G. Duan, Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 644–648.

- <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.007>
- [63] A.F.M. El Walily, S.F. Belal, E.A. Heaba, A. El Kersh, Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 851–856. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(95\)01346-M](https://doi.org/10.1016/0731-7085(95)01346-M)
- [64] J. Mehta, L.M. Lopez, A.D. Thorman, Lisinopril versus lisinopril plus hydrochlorothiazide in essential hypertension, *Am. J. Cardiol.* 61 (1988) 803–806. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(88\)91070-3](https://doi.org/10.1016/0002-9149(88)91070-3)
- [65] A. V. Patel, J. R., Pethani, T. M., Vachhani, A. N., Sheth, N. R., Dudhrejiya, Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 970C (2014) 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.023>
- [66] H.C. Yao, M. Sun, X.F. Yang, Z.Z. Zhang, H. Li, Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide by time-resolved chemiluminescence with artificial neural network calibration, *J. Pharm. Anal.* 1 (2011) 32–38. [https://doi.org/10.1016/S2095-1779\(11\)70006-5](https://doi.org/10.1016/S2095-1779(11)70006-5)
- [67] T.T. Liu, L.L. Xiang, J.L. Wang, D.Y. Chen, Application of capillary electrophoresis-frontal analysis for comparative evaluation of the binding interaction of captopril with human serum albumin in the absence and presence of hydrochlorothiazide, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115 (2015) 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.022>
- [68] D.T. Gimenes, M.C. Marra, J.M. De Freitas, R.A. Abarza Muñoz, E.M. Richter, Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 212 (2015) 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.01.132>
- [69] J. Ouyang, W.R.G. Baeyens, J. Delanghe, G. Van Der Weken, W. Van Daele, D. De Keukeleire, A.M. García Campaña, Chemiluminescence-based liquid chromatographic

- determination of hydrochlorothiazide and captopril, *Anal. Chim. Acta.* 386 (1999) 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00020-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00020-3)
- [70] I. Panderi, M. Parissi-Poulou, Determination of captopril and captopril-hydrochlorothiazide combination in tablets by derivative UV spectrophotometry, *Int. J. Pharm.* 86 (1992) 99–106. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90185-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90185-5)
- [71] M.B. Gholivand, M. Khodadadian, Simultaneous Voltammetric Determination of Captopril and Hydrochlorothiazide on a Graphene/Ferrocene Composite Carbon Paste Electrode, *Electroanalysis.* 25 (2013) 1263–1270. <https://doi.org/10.1002/elan.201200665>
- [72] S.J. Varghese, T.K. Ravi, Simultaneous determination of ramipril, hydrochlorothiazide and telmisartan in tablet dosage form using HPLC, *Pharm. Lett.* 3 (2011) 83–90.
- [73] M.M. Baing, V. V. Vaidya, R.T. Sane, S.N. Menon, K. Dalvi, Simultaneous RP-LC Determination of Losartan Potassium, Ramipril, and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations, *Chromatographia.* 64 (2006) 293–296. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0008-6>
- [74] I.F. Al-Momani, Determination of hydrochlorothiazide and enalapril maleate in tablet formulations by reversed-phase HPLC, *Turkish J. Chem.* 25 (2001) 49–54.
- [75] B. Uslu, T. Özden, HPLC and UPLC Methods for the Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms, *Chromatographia* 76 (2013) 1487–1494. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2442-6>
- [76] C.A.R. Salamanca-Neto, P.H. Hatumura, C.R.T. Tarley, E.R. Sartori, Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode, *Ionics (Kiel).* 21 (2015) 1615–1622. <https://doi.org/10.1007/s11581-014-1349-z>
- [77] A. El-Gindy, A. Ashour, L. Abdel-Fattah, M.M. Shabana, Application of LC and HPTLC-densitometry for the simultaneous determination of benazepril hydrochloride and

- hydrochlorothiazide, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 171–179. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00480-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00480-5)
- [78] I.E. Panderi, Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by second-order derivative spectrophotometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 257–265. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00134-X)
- [79] I.E. Panderi, M. Parissi-Poulou, Simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide by micro-bore liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 1017–1024. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00195-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00195-8)
- [80] A. El-Gindy, A. Ashour, L. Abdel-Fattah, M.M. Shabana, Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative, second derivative of the ratio spectra and chemometric methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 299–307. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00502-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00502-1)
- [81] A. El-Gindy, A. Ashour, L. Abdel-Fattah, M.M. Shabana, Spectrophotometric and HPTLC-densitometric determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in binary mixtures, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 923–931. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00382-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00382-X)
- [82] S.H. Ahmadi, H. Tavakoli, M.R. Sangi, M. Amirzadeh, Simultaneous infrared spectrometric determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods, *Jordan J. Pharm. Sci.* 8 (2015) 12–20. <https://doi.org/10.12816/0026455>
- [83] D. Ivanović, M. Medenica, B. Jančić, N. Knežević, A. Malenović, J. Milić, Validation of an analytical procedure for simultaneous determination of hydrochlorothiazide, lisinopril, and their impurities, *Acta Chromatogr.* (2007) 143–156.
- [84] H.W. Darwish, S.A. Hassan, M.Y. Salem, B.A. El-zeany, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Comparative study between derivative spectrophotometry and multivariate calibration as analytical tools applied for the simultaneous quantitation of Amlodipine, Valsartan and Hydrochlor, *Spectrochim. Acta*

- Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 113 (2013) 215–223.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.04.068>
- [85] A.P.P. Eisele, G.R. Mansano, F.M. De Oliveira, J. Casarin, C.R.T. Tarley, E.R. Sartori, Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and valsartan in combined dosage forms: Electroanalytical performance of cathodically pretreated boron-doped diamond electrode, *J. Electroanal. Chem.* 732 (2014) 46–52.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2014.08.033>
- [86] E. Şatana, Ş. Altınay, N.G. Göger, S.A. Özkan, Z. Şentürk, Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and LC, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 1009–1013.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00394-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00394-6)
- [87] S.G. Gadepalli, P. Deme, M. Kuncha, R. Sistla, Simultaneous determination of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide by LC-ESI-MS/MS and its application to pharmacokinetics in rats, *J. Pharm. Anal.* 4 (2014) 399–406.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.12.003>
- [88] New Approaches for Simultaneous API and Counterion Analysis Using Charged Aerosol Detection. Dionex. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/87447-PO-IICS-API-Counterion-CAD-18Oct2010-LPN2610-01.pdf>. Acessado às 09:30h de 22/02/2018.
- [89] T.D. Mai, P.C. Hauser, 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* 1267 (2012) 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.005>
- [90] M.N. Calisevici, D.M. Perju, M.C. Lysandrou, G.A. Dumitrel, M. Glevitzky, Determination of anion and cation contents in Cyprus drinking waters by HPLC method, *J. Food Agric. Environ.* 9 (2011) 65–68.

- [91] H.B. Meng, T.R. Wang, B.Y. Guo, Y. Hashi, C.X. Guo, J.M. Lin, Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography, *Talanta* 76 (2008) 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.054>
- [92] C. Crafts, B. Bailey, M. Plante, I. Acworth, Evaluation of methods for the simultaneous analysis of cations and anions using HPLC with charged aerosol detection and a zwitterionic stationary phase, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 534–539. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.7.534>
- [93] R. Saari-Nordhaus, J.M. Anderson, Simultaneous analysis of anions and cations by single-column ion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 549 (1991) 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)91437-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)91437-7)
- [94] P. Kubáň, B. Karlberg, P. Kubá, V. Kubá, 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.* 964 (2002) 227–241. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00656-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00656-8)
- [95] B.S. Weekley, J.P. Foley, Dual-opposite-injection CZE: Theoretical aspects and application to organic and pharmaceutical compounds, *Electrophoresis.* 28 (2007) 697–711. <https://doi.org/10.1002/elps.200600608>
- [96] C. Lopez, R. Nehme, B. Claude, Ph. Morin, J.P. Max, R. Pena, M. Pelissou, J.P. Ribet, 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* 75 (2012) 25–32. <https://doi.org/10.1007/s10337-011-2154-8>
- [97] F. Priego-Capote, M.D.L. de Castro, Dual injection capillary electrophoresis: Foundations and applications, *Electrophoresis* 25 (2004) 4074–4085. <https://doi.org/10.1002/elps.200406135>
- [98] R. Nehmé, A. Lascaux, R. Delépée, B. Claude, P. Morin, 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* 663 (2010) 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.032>
- [99] C. Johns, W. Yang, M. MacKa, P.R. Haddad, Simultaneous separation of anions and cations by capillary electrophoresis with high magnitude, reversed electroosmotic flow, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 217–222. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01398-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01398-6)
- [100] P.A. Gallagher, N.D. Danielson, Capillary electrophoresis of cationic and anionic surfactants with indirect conductivity detection, *J. Chromatogr. A* 781 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00389-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00389-0)
- [101] F. Foret, S. Fanali, L. Ossicini, P. Boček, Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 470 (1989) 299–308. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83558-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83558-5)
- [102] S.A. Shamsi, N.D. Danielson, Individual and Simultaneous Class Separations of Cationic and Anionic Surfactants Using Capillary Electrophoresis with Indirect Photometric Detection, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4210–4216. <https://doi.org/10.1021/ac00118a027>
- [103] M.C. Marra, P.L. Silva, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, Ultra-fast determination of scopolamine, orphenadrine, mepyramine, caffeine, dipyrone, and ascorbic acid by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 913–919. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140061>
- [104] T. Soga, G.A. Ross, Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 834 (1999) 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00692-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00692-X)
- [105] C. Sarazin, N. Delaunay, A. Varenne, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, Simultaneous capillary electrophoretic analysis of inorganic anions and cations in post-blast extracts of acidaluminum mixtures, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3177–3183. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000396>

- [106] O. V. Krokhin, H. Hoshino, O.A. Shpigun, T. Yotsuyanagi, 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* 776 (1997) 329–336. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00420-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00420-2)
- [107] D. Heiger, High performance capillary electrophoresis, *Agil. Technol.* (2000) 11–19.
- [108] M.F.M. Tavares, Eletroforese capilar: Conceitos básicos, *Quim. Nova* 19 (1995) 173–181.
- [109] S. Hjertén, Free zone electrophoresis, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967) 122–219. [https://doi.org/10.1016/0009-5907\(67\)80003-6](https://doi.org/10.1016/0009-5907(67)80003-6)
- [110] J.W. Jorgenson, K.D.A. Lukacs, Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298–1302. <https://doi.org/10.1021/ac00231a037>
- [111] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Free-zone electrophoresis in glass capillaries., *Clin. Chem.* 27 (1981) 1551–1553.
- [112] J. Jorgenson, K. Lukacs, Capillary Zone Electrophoresis, *Science* 53 (1983) 266–272. <https://doi.org/10.1126/science.6623076>
- [113] K.D. Altria, Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 856 (1999) 443–463. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00830-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00830-4)
- [114] J.L. Veuthey, Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis, *Anal. Bioanal. Chemic.* 381 (2005) 93–95. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2902-9>
- [115] S. Terabe, N. Matsubara, Y. Ishihama, Y. Okada, Microemulsion electrokinetic chromatography: comparison with micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A* 608 (1992) 23–29. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87102-E](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87102-E)
- [116] R.A. Wallingford, Oligomeric separation of ionic and nonionic ethoxylated polymers by capillary gel electrophoresis, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2541–2548. <https://doi.org/10.1021/ac951179c>
- [117] P.G. Righetti, A. Bossi, Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Recent analytical and preparative developments, *Anal. Biochem.* 247 (1997) 1–10.

<https://doi.org/10.1006/abio.1997.2000>

- [118] W.K.T. Coltro, Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica, Tese de doutorado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- [119] M.F.M. Tavares, V.L. McGuffin, Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 129–142.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(94\)89014-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(94)89014-5)
- [120] V.L. McGuffin, M.F.M. Tavares, Computer-Assisted Optimization of Separations in Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.* 69 (1997) 152–164.
<https://doi.org/10.1021/ac961048r>
- [121] R.R. Cunha, D.T. Gimenes, R.A.A. Munoz, C.L. Do Lago, E.M. Richter, Simultaneous determination of diclofenac and its common counter-ions in less than 1 minute using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 34 (2013) 1423–1428. <https://doi.org/10.1002/elps.201300008>
- [122] M.C. Marra, R.R. Cunha, D.T.R. Vidal, R.A.A. Munoz, C.L. do Lago, E.M. Richter, 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* 1327 (2014) 149–154.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.048>
- [123] M.F.M. Tavares, Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Quim. Nova* 20 (1997) 493–511. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000500010>
- [124] A.F. Faria, Desenvolvimento, otimização e validação de metodologias por eletroforese capilar para análise de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, Tese de doutorado - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.
- [125] J.A.F. Da Silva, W.K.T. Coltro, E. Carrilho, M.F.M. Tavares, Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares, *Quim. Nova* 30 (2007) 740–744.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300040>

- [126] J.A.F. Da Silva, Detecção condutométrica sem contato (oscilométrica) para eletroforese capilar de zona e cromatografia micelar eletrocínética. Dissertação de Mestrado em Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- [127] M. Sulpuzi, M.P. Gaigeot, M. Sprik, The Silica-Water Interface: How the Silanols Determine the Surface Acidity and Modulate the Water Properties, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (2012) 1037–1047. <https://doi.org/10.1021/ct2007154>
- [128] M.S. Bello, L. Capelli, P.G. Righetti, Dependence of the electroosmotic mobility on the applied electric field and its reproducibility in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 311–322. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00545-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00545-1)
- [129] A.D. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, R.S. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, Thonson, Learning, 2014. Tradução da 9a ed. norte americana.
- [130] R. Colombara, M.F.M. Tavares, S. Massaro, Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: Características e aplicações, *Quim. Nova* 20 (1997) 512–518. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000500011>
- [131] J.A. Fracassi Da Silva, C.L. Do Lago, An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4339–4343. <https://doi.org/10.1021/ac980185g>
- [132] K.J.M. Francisco, C.L. Do Lago, A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector, *Electrophoresis* 30 (2009) 3458–3464. <https://doi.org/10.1002/elps.200900080>
- [133] W.J. Bockel, E.M.A. Martini, D. Samios, C.M.S. Piatnicki, A laboratory-made capillary electrophoresis equipment with conductometric detection, *Quim. Nova* 28 (2005) 1106–1110. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600027>
- [134] F.S. Lopes, Hifenização da eletroforese capilar com sistema eletroquímico em fluxo: desenvolvimento de instrumentação para a determinação de íons metálicos com pré-concentração eletroquímica e para o estudo da oxidação de alcoóis, Tese de doutorado -

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

- [135] A. Marsh, K. Altria, Use of multiplexed CE for pharmaceutical analysis, *Chromatographia* 64 (2006) 327–333. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0023-7>
- [136] F. Opekar, P. Coufal, K. Štulík, Rapid Capillary Zone Electrophoresis Along Short Separation Pathways and Its Use in Some Hyphenated Systems: A Critical Review, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4487–4499. <https://doi.org/10.1021/cr900018r>
- [137] F.M. Matysik, Advances in fast electrophoretic separations based on short capillaries, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 961–965. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3586-y>
- [138] D.T. Gimenes, R.R. Cunha, M.M.A.D.C. Ribeiro, P.F. Pereira, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, Two new electrochemical methods for fast and simultaneous determination of codeine and diclofenac, *Talanta* 116 (2013) 1026–1032. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.020>
- [139] R.H.O. Montes, M.C. Marra, M.M. Rodrigues, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, Fast Determination of Ciprofloxacin by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection and Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection, *Electroanalysis* 26 (2014) 432–438. <https://doi.org/10.1002/elan.201300474>
- [140] P.F. Pereira, M.C. Marra, R.R. Cunha, W.P. Da Silva, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine, *J. Electroanal. Chem.* 713 (2014) 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.11.031>
- [141] G.A. Micke, A.C.O. Costa, M. Heller, M. Barcellos, M. Piovezan, T. Caon, M.A.L. de Oliveira, Development of a fast capillary electrophoresis method for the determination of propranolol—Total analysis time reduction strategies, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7957–7961. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.083>
- [142] M.M.A.C. Ribeiro, T.C. Oliveira, A.D. Batista, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, A sub-minute electrophoretic method for simultaneous determination of naphazoline and zinc, *J.*

- Chromatogr. A 1472 (2016) 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.031>
- [143] M. Piovezan, A.C.O. Costa, A.V. Jager, M.A.L. de Oliveira, G.A. Micke, Development of a fast capillary electrophoresis method to determine inorganic cations in biodiesel samples, *Anal. Chim. Act.* 673 (2010) 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.031>
- [144] S. Hapuarachchi, S.P. Premeau, C.A. Aspinwall, High-speed capillary zone electrophoresis with online photolytic optical injection, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3674–3680. <https://doi.org/10.1021/ac051645q>
- [145] M.D. Dolzan, D.A. Spudeit, M.S. Azevedo, A.C.O. Costa, M.A.L. De Oliveira, G.A. Micke, A fast method for simultaneous analysis of methyl, ethyl, propyl and butylparaben in cosmetics and pharmaceutical formulations using capillary zone electrophoresis with UV detection, *Anal. Methods* 5 (2013).
- [146] W.K. Tomazelli Coltro, J.A. Fracassi da Silva, E. Carrilho, Rapid prototyping of polymeric electrophoresis microchips with integrated copper electrodes for contactless conductivity detection, *Anal. Methods* 3 (2011) 168–172. <https://doi.org/10.1039/C0AY00486C>
- [147] E.R. da Silva, T.P. Segato, W.K.T. Coltro, R.S. Lima, E. Carrilho, L.H. Mazo, Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection, *Electrophoresis* 34 (2013) 2107–2111. <https://doi.org/10.1002/elps.201200588>
- [148] L.C. Gonçalves Filho, G.A. Micke, Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 477–480. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.063>
- [149] K. Swinney, D.J. Bornhop, Detection in capillary electrophoresis., *Electrophoresis* 21 (2000) 1239–1250. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1239::AID-ELPS1239>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1239::AID-ELPS1239>3.0.CO;2-6)
- [150] J.A. Fracassi Da Silva, Detecção eletroquímica em eletroforese capilar, *Quim. Nova.* 26 (2003) 56–64. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100012>

- [151] B. Gas, C. Sanger, P. Muijselaar, High performance capillary electrophoresis, 2009.
- [152] A.L. Crego, M. Luisa Marina, UV-Vis absorbance detection in capillary electrophoresis, *Compr. Anal. Chem.* 45 (2005) 225–304. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(05\)45005-9](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(05)45005-9)
- [153] W. Buchberger, C.W. Klampfl, F. Eibensteiner, K. Buchgraber, Determination of fermenting acids in silage by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 766 (1997) 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)01015-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)01015-1)
- [154] A. Owen, Fundamentals of UV-visible spectroscopy, *Vasa* 1 (1996) 1–136.
- [155] A.J. Zemann, Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 24 (2003) 2125–2137. <https://doi.org/10.1002/elps.200305476>
- [156] R.K. Henderson, A. Baker, K.R. Murphy, A. Hambly, R.M. Stuetz, S.J. Khan, Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review, *Water Res.* 43 (2009) 863–881. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.027>
- [157] V.A. Galievsky, A.S. Stasheuski, S.N. Krylov, “Getting the best sensitivity from on-capillary fluorescence detection in capillary electrophoresis” – A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 935 (2016) 58–81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.015>
- [158] J.J.P. Mark, R. Scholz, F.M. Matysik, Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 45–64. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.009>
- [159] G.D. Sisk, G. Herzog, J.D. Glennon, D.W.M. Arrigan, Assessment of ion transfer amperometry at liquid-liquid interfaces for detection in CE, *Electrophoresis* 30 (2009) 3366–3371. <https://doi.org/10.1002/elps.200900285>
- [160] J. a Fracassi da Silva, C.L. do Lago, Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector., *Electrophoresis* 21 (2000) 1405–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1405::AID-ELPS1405>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1405::AID-ELPS1405>3.0.CO;2-O)

- [161] B. Gaš, M. Demjanenko, J. Vacík, High-frequency contactless conductivity detection in isotachopheresis, *J. Chromatogr. A* 192 (1980) 253–257. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(80\)80001-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(80)80001-X)
- [162] A.J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, G.K. Bonn, Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis., *Anal. Chem.* 70 (1998) 563–567. <https://doi.org/10.1021/ac9707592>
- [163] X. Huang, T.K.J. Pang, M.J. Gordon, R.N. Zare, On-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2747–2749. <https://doi.org/10.1021/ac00150a004>
- [164] X. Huang, R.N. Zare, S. Sloss, A.G. Ewing, End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 189–192. <https://doi.org/10.1021/ac00002a020>
- [165] X. Huang, R.N. Zare, Improved End-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2193–2196. <https://doi.org/10.1021/ac00019a022>
- [166] R.R. Cunha, Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D), Dissertação de mestrado - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.
- [167] J.G. Alves Brito-Neto, J.A. Fracassi Da Silva, L. Blanes, C.L. Do Lago, Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals, *Electroanalysis* 17 (2005) 1198–1206. <https://doi.org/10.1002/elan.200503237>
- [168] J.G. Alves Brito-Neto, J.A. Fracassi Da Silva, L. Blanes, C.L. Do Lago, Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics, *Electroanalysis* 17 (2005) 1207–1214. <https://doi.org/10.1002/elan.200503238>
- [169] P. Kuban, P.C. Hauser, 20th anniversary of axial capacitively coupled contactless

- conductivity detection in capillary electrophoresis, *Trend Anal. chem.* 102 (2018) 311-321.
- [170] IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology. Disponível em <http://goldbook.iupac.org/pdf/goldbook.pdf>. Acessado às 13h de 15/01/2018.
- [171] G.P. Carr, J.C. Wahlich, A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis, 8 (1990) 613-618.
- [172] G.M. Lawson, Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus, 40 (1994) 1218-1219.
- [173] D.A. Armbruster, M.D. Tillman, L.M. Hubbs, Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs, *Clin. Chem.* 40 (1994) 1233–1238.
- [174] ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 166 de 24/07/2017. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.
- [175] T. Nogueira, C.L. do Lago, Determination of Ca, K, Mg, Na, sulfate, phosphate, formate, acetate, propionate, and glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Microchem. J.* 99 (2011) 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.05.014>
- [176] R.R. Cunha, M.M.A.C. Ribeiro, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, Fast determination of codeine, orphenadrine, promethazine, scopolamine, tramadol, and paracetamol in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 1815–1823. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601275>
- [177] A.R. McIntyre, N.S. Lipman, Amoxicillin-clavulanic acid and trimethoprim-sulfamethoxazole in rodent feed and water: effects of compounding on antibiotic stability, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46 (2007) 26–32.
- [178] S.B. Madasu, N.A. Vekariya, C. Koteswaramma, A. Islam, P.D. Sanasi, R.B. Korupolu, An efficient, commercially viable, and safe process for preparation of losartan potassium, an

angiotensin II receptor antagonist, *Org. Process Res. Dev.* 16 (2012) 2025–2030.

<https://doi.org/10.1021/op300179u>

[179] Apesar da crise, indústria farmacêutica aumentou em 20% as contratações e continua crescendo. Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/carreira/apesar-da-crise-industria-farmaceutica-aumentou-em-20-as-contratacoes-e-continua-crescendo/>>. Acessado às 21:43 de 22/02/2018.

[180] V. Ranade, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, Fourth Edition, *Am. J. Ther.* 13 (2006) 91.

7. Trabalhos desenvolvidos no período

D.F. Gimenes, M.C. Marra, J.M. de Freitas, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection, *Sens. Actuators. B Chem.* 212 (2015) 411–418.

J.F. Stefano, D.S. Cordeiro, M.C. Marra, E.M. Richter, R.A.A. Muñoz, Batch-injection versus flow-injection analysis using screen-printed electrodes: determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations, *Electroanalysis* 27 (2015) 350–357.

P.F. Pereira, W.P. da Silva, M.C. Marra, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, A high-throughput BIA-MPA method for the simultaneous determination of amiloride and furosemide, *Anal. Methods* 8 (2016) 7959–7965.

M.C. Marra, R.R. Cunha, R.A.A. Muñoz, A.D. Batista, E.M. Richter, Single-run capillary electrophoresis method for the fast simultaneous determination of amoxicillin, clavulanate, and potassium, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 3557–3562.

M.M.A.C. Ribeiro, M.C. Marra, B.M.C. Costa, T.C. Oliveira, A.D. Batista, R.A.A. Muñoz, E.M. Richter, Sub-Minute Method for Determination of Naphazoline in the Presence of Diphenhydramine, Pheniramine or Chlorpheniramine by Capillary Electrophoresis. *J. Braz. Chem. Soc.* (2018) 1959–1964.

M.C. Marra, B.M.C. Costa, R.A.A. Muñoz, M.H.P. Santana, A.O. Maldaner, E.D. Botelho, W.K.T. Coltro, E.M. Richter, Fast determination of cocaine and some common adulterants in seized cocaine samples by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Anal. Methods* 10 (2018) 2875–2880.

B.M.C. Costa, M.C. Marra, T.C. Oliveira, R.A.A. Muñoz, A.D. Batista, C.L. do Lago, E.M.

Richter, Ultrafast capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of ammonium and diphenhydramine in pharmaceutical samples, *J. Sep. Sci.* (2018). doi: 10.1002/jssc.201800273

R.C. Moreira, B.M.C. Costa, M.C. Marra, M.H.P. Santana, A.O. Maldaner, E.D. Botelho, T.R.L.C. Paixão, E.M. Richter, W.K.T. Coltro, Screening of seized cocaine samples using electrophoresis microchips with integrated contactless conductivity detection, *Electrophoresis* (2016). doi: 10.1002/elps.201800137.

M.C. Marra, B.M.C. Costa, R.A.A. Muñoz, A.D. Batista, E.M. Richter, Ultrafast determination of hydrochlorothiazide, losartan and potassium in pharmaceutical samples by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. (Artigo em redação)

M.C. Marra, R.A.A. Muñoz, A.D. Batista, E.M. Richter, Sub-minute capillary electrophoresis method for the fast determination of hydrochlorothiazide in the presence of atenolol, metoprolol, propranolol, valsartan, benazepril, captopril, enalapril, lisinopril or ramipril. (Artigo em redação)