

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química Programa de Pós-graduação em Química

**Eletroforese capilar (CE-C⁴D) aplicada à análise rápida de amônio,
difenidramina, arginina, ácido ascórbico e aspartato em
formulações farmacêuticas**

BRENDA MARIA DE CASTRO COSTA

Dissertação - Mestrado

Orientador

PROF. DR. EDUARDO MATHIAS RICHTER

Co-orientador

PROF. DR. ALEX DOMINGUES BATISTA

Uberlândia

Julho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Química Programa de Pós-graduação em Química

**Eletroforese capilar (CE-C⁴D) aplicada à análise rápida de amônio,
difenidramina, arginina, ácido ascórbico e aspartato em
formulações farmacêuticas**

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

Aluno: Brenda Maria de Castro Costa

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Domingues Batista

Área de concentração: Química Analítica

Uberlândia

Julho de 2018

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

B837e Costa, Brenda Maria de Castro, 1994-
2018 Eletroforese capilar (CE-C4D) aplicada à análise rápida de amônio, difenidramina, arginina, ácido ascórbico e aspartato em formulações farmacêuticas [recurso eletrônico] / Brenda Maria de Castro Costa. - 2018.

Orientador: Eduardo Mathias Richter.
Coorientador: Alex Domingues Batista.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1170>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Eletroforese capilar. 3. Vitamina C. 4. Amônio. 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



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 285/PPQUI.

DATA: 06/07/2018

DISCENTE: Brenda Maria de Castro Costa

MATRÍCULA: 11622QMI002

TÍTULO DO TRABALHO: Determinação simultânea de difenidramina, ibuprofeno e amônio em formulações farmacêuticas usando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D).

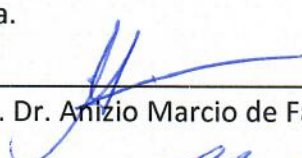
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

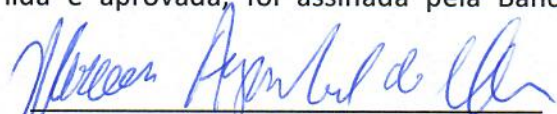
LINHA DE PESQUISA: Eletroquímica Aplicada

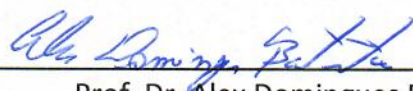
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de métodos eletroquímicos aplicados a análise de formulações farmacêuticas e combustíveis

Às nove horas do dia seis de julho do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Universidade Federal de Juiz de Fora e Prof. Dr. Alex Domingues Batista, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprova o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Eletroforese capilar (CE-C4D) aplicada a análise rápida de amônio, difenidramina, arginina, ácido ascórbico e aspartato em formulações farmacêuticas.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 12 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria


Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira


Prof. Dr. Alex Domingues Batista

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Dedico este trabalho à minha mãe Hilda, a mesma que nunca duvidou do meu potencial, a minha vó Hilda (*in memoriam*) que ajudou os meus pais na minha criação, os valores que tenho hoje, são provenientes desta mulher incrível que foi, e ao meu pai Marcio o qual me encorajou a ser forte e não desistir dos meus objetivos.

Dedico também à minha vó Josefa e vô Ivaldo (*in memoriam*), que mesmo com a distância geográfica me proporcionaram o sentimento do que é ser/ter uma família presente.

Ao meu orientador, Eduardo, pelo conhecimento compartilhado, pela dedicação, paciência e entusiasmo.

A todos os amigos que essa jornada de trabalho me proporcionou, obrigada pela ajuda, incentivo e pelos bons momentos de alegria e diversão.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo gostaria de agradecer a Deus pelas grandes pessoas em minha vida, pela oportunidade proporcionada ao entrar no programa de pós-graduação.

A todos do IQ-UFU, que estiveram presentes nessa etapa e a deixaram mais leve e divertida, mesmo em meio a obstáculos, me incentivaram a não desistir e seguir firme. Especialmente aos alunos do Nupe: Aliceana, Ana Paula, Jéssica, Jhonys, Mariana, Michelle, Thiago Costa, Thiago Tormim, Raquel e Rafael. A todos do Laboratório de Espectroscopia Aplicada (LEA), onde iniciei minha jornada na iniciação científica.

Aos meus queridos amigos, companheiros de vida Hanna, Lara, André, Lucas, Fernanda, Breno, as minhas goianas, amigas de infância, Karolina, Bruna, Amanda, Jéssica e Kaysse. Em Uberlândia conquistei alguém que quero levar sempre ao meu lado, meu namorado Thiago Versiani obrigada por todo amor, compreensão e incentivo.

A todos os técnicos e professores do Instituto de Química pela atenção e pelo belo trabalho de ensinar e educar. Ao prof. Dr. Alex Batista por compartilhar suas ideias e conhecimentos, por todas as contribuições para meu crescimento profissional.

Aos examinadores da banca, por dedicarem seu tempo à leitura e estudo do meu trabalho.

Ao prof. Dr. Eduardo Mathias Richter por confiar em mim, pela oportunidade de trabalho e dedicação como orientador. Obrigada pelo apoio e conselhos quando precisei e agradeço de todo o coração por me conduzir a ser uma profissional independente e criativa.

A minha família maravilhosa que sempre me apoiou, na carreira profissional, me instigando sempre buscar o melhor para mim.

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

RESUMO

Neste presente trabalho, a técnica de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D) foi utilizada em dois novos procedimentos analíticos para a determinação rápida e simultânea de: (i) difenidramina (DIP) e amônio (NH₄⁺); (ii) arginina (ARG), ácido ascórbico (ASC) e aspartato (ASP). Os dois métodos são caracterizados por análises com tempos inferiores a 50 s, e foram desenvolvidos com a finalidade de controle de qualidade de matérias primas e formulações farmacêuticas que apresentam tais compostos em sua composição. Para a determinação simultânea do grupo (i) foi utilizado o tampão de corrida (BGE) composto por 30 mmol L⁻¹ de Ácido 2-(morfolin-4-il)etano-1-sulfônico (MES) e 15 mmol L⁻¹ de LiOH (pH=6,0). Os limites de detecção (LOD) foram de 0,04 e 0,02 mmol L⁻¹ para NH₄⁺ e DIP, respectivamente. O método apresentou boa exatidão com valores de recuperação entre 97 e 106%. Os resultados obtidos pelo método proposto foram estatisticamente similares (nível de confiança de 95%) aos obtidos por HPLC (DIP) e pelo método de Kjeldahl (NH₄⁺). Para a determinação simultânea do grupo (ii) foi utilizado o BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de 3- [[2-Hidroxi-1,1bis(hidroximetil)etil]amino]-1-propanossulfônico (TAPS) e 10 mmol L⁻¹ de NaOH (pH=8,7). Os LOD foram de 0,01; 0,035 e 0,02 mmol L⁻¹ para ARG, ASC e ASP, respectivamente. O método apresentou resultados satisfatórios no estudo de adição e recuperação (entre 100% e 105%) nas amostras contendo ARG, ASC e ASP. As curvas de calibração para todas as espécies quantificadas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,996 e RSD menores que 2,9% (n=10). Os métodos CE-C⁴D desenvolvidos são simples, geram quantidades mínimas de resíduos (menor impacto ambiental), além do baixo custo (equipamento e manutenção) e possuem elevadas frequências de injeção: ~ 90 injeções h⁻¹ para formulação (i) e ~78 injeções h⁻¹ para formulação (ii).

Palavras Chave: ácido ascórbico, amônio, arginina, aspartato, determinação simultânea, difenidramina, eletroforese capilar, detecção condutométrica sem contato, análises rápidas.

ABSTRACT

In the present work, capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection (CE-C⁴D) was used for the development of two rapid methods for simultaneous determination of: (i) diphenhydramine (DIP) and ammonium; (ii) arginine (ARG), ascorbic acid (ASC) and aspartate (ASP). The proposed methods are characterized by analyzes with run times less than 50 s and can be used in quality control of raw materials and pharmaceutical formulations having such compounds in its composition. In the simultaneous determination of the compounds of the group (i), the BGE was composed by 30 mmol L⁻¹ of 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) and 15 mmol L⁻¹ LiOH (pH=6,0). The limits of detection (LOD) were 0.04 and 0.02 mmol L⁻¹ for NH₄⁺ and DIP, respectively. The method was accurate with recovery values between 97 and 106%. The results obtained with the proposed method were statistically similar (confidence level of 95%) to those obtained by HPLC (DIP) and Kjeldahl method (NH₄⁺). For the simultaneous determination of the compounds of the group (ii), the BGE was composed by 20 mmol L⁻¹ N- [Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS) and 10 mmol L⁻¹ of NaOH (pH=8,7). The LOD were 0.01, 0.035 and 0.02 mmol L⁻¹ for ARG, ASC and ASP, respectively. In addition, the proposed method presented satisfactory results in the recovery test (100% to 105%) for samples containing ARG, ASC and ASP. Calibration curves for all species showed correlation coefficients greater than 0.996 and RSD values in the stability study less than 2.9% (n = 10). Furthermore, the CE-C⁴D methods are simple, generates a minimum amount of waste (lower environmental impact), are low cost (equipment and maintenance) and has a high analytical frequency: ~90 injections h⁻¹ (i) and ~78 injections h⁻¹ (ii).

Keywords: ascorbic acid, ammonium, aspartate, arginine, simultaneous determination, diphenhydramine, capillary electrophoresis, contactless conductivity detection, fast analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais da DIP ($pK_a = 8,9$) e NH_4^+ ($pK_a = 9,3$). FONTE: [5].....	19
Figura 2. Fórmulas estruturais da ARG, ASP e ASC, respectivamente. FONTE: [5]	20
Figura 3. Ilustração do princípio envolvido na estabilização de zonas (Z) por rotação do tubo de eletroforese. Se a rotação for parada, a forma da zona em (A) se espalhará como mostrado em (B).....	25
Figura 4. Comparação das larguras dos picos do álcool benzílico ($C_6H_5CH_2OH$) na CE e na HPLC. FONTE [112]:.....	30
Figura 5. Efeito do pH na mobilidade eletrosmótica em capilares de diferentes materiais. FONTE: [116].....	34
Figura 6. Representação da interface do capilar com a aplicação de um potencial.....	35
Figura 7. Esquema ilustrativo das grandezas vetoriais v_{eo} e v_{ep}	36
Figura 8. Ilustração dos possíveis mecanismos de separação de ânions por eletroforese capilar sendo (A) EOF e polaridade normal; (B) EOF normal e polaridade invertida e, (C) Inversão de EOF e polaridade invertida. FONTE: [117]	37
Figura 9. Perfis dos fluxos eletrosmótico, típico de CE (a) e laminar, próprio de HPLC (b), e suas correspondentes zonas de amostras. FONTE [116]:	39
Figura 10. Desenhos de células de fluxo em seu eixo longitudinal. A = célula de bolha; B = célula de alta sensibilidade; C = célula Z. FONTE: [121]	45
Figura 11. Esquema do sistema de detecção C^4D com a representação de um eletroferograma de analitos com mobilidades diferentes. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção. FONTE: próprio autor.....	52
Figura 12. Imagem do equipamento de CE usado nos estudos.	57
Figura 13. Esquema do sistema CE e modo de injeção hidrodinâmica (pressão positiva) usado nesse trabalho. FONTE: [120].....	58

Figura 14. Estruturas moleculares com valores de pKa do NH_4^+ e DIP e suas respectivas curvas da relação de carga versus pH. 66

Figura 15. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo NH_4^+ , Na^+ e DIP ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) nos seguintes BGE's: (1) 20 mmol L^{-1} MES/ 20 mmol L^{-1} HIS (pH=6,0); (2) 10 mmol L^{-1} TRIS/ 10 mmol L^{-1} TAPS (pH=8,4); (3) 12 mmol L^{-1} TEA/ 1.8 mmol L^{-1} ácido oxálico (pH=8,6); (4) 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH (pH=8,5); (5) 20 mmol L^{-1} ácido bórico + NaOH (pH=8,5). Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: $50 \mu\text{m}$ 68

Figura 16. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão e amostra contendo NH_4^+ (20 mmol L^{-1}), DIP ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$) e Na^+ ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} MES/ 20 mmol L^{-1} HIS (pH=6,0). Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: $50 \mu\text{m}$ 69

Figura 17. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução amostra contendo NH_4^+ (10 mmol L^{-1}), Na^+ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) nos seguintes BGE's: (1) 30 mmol L^{-1} MES/ 15 mmol L^{-1} NaOH (pH=6,0) e (2) 30 mmol L^{-1} MES/ 15 mmol L^{-1} LiOH (pH=6,0). Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: $50 \mu\text{m}$ 70

Figura 18. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo NH_4^+ (5 mmol L^{-1}) e DIP ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: MES (10; 30; 50 mmol L^{-1}) pH = 6,0, ajustado com LiOH. Demais condições: Vide figura 17. 71

Figura 19. Curvas analíticas e picos da DIP em BGE's de diferentes concentrações. 72

Figura 20. Estudo do tempo de injeção utilizando uma solução amostra contendo NH_4^+ (10 mmol L^{-1}), DIP ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) e Na^+ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: 30 mmol L^{-1} de MES + 15 mmol L^{-1} de LiOH, pH = 6,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 – 2,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal. 74

Figura 21. Estudo da repetibilidade do tempo de migração dos íons utilizando uma solução padrão contendo NH_4^+ (15 mmol L^{-1}) e DIP ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: 30 mmol L^{-1} de MES + 15 mmol L^{-1} de LiOH, pH = 6,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa 1,2s; potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.	75
Figura 22. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões em concentrações crescentes de NH_4^+ ($2,5\text{-}20 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,05\text{-}0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas analíticas. Demais condições vide Figura 20.	76
Figura 23. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões em concentrações crescentes de NH_4^+ e DIP ($0,1\text{-}10 \text{ mmol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas analíticas. Demais condições vide Figura 20.....	77
Figura 24. Curvas analíticas de NH_4^+ ($5\text{-}17,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,1\text{-}0,6 \text{ mmol L}^{-1}$).	78
Figura 25. Eletroferogramas obtidos a partir da introdução de três soluções de amostras comerciais distintas contendo NH_4^+ (10 mmol L^{-1}) e DIP ($200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições vide figura 20.....	80
Figura 26. Fórmulas estruturais com valores de pKa da ARG, ASP e ASC e suas curvas de distribuição de carga em função do pH.....	83
Figura 27. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG, ASP e ASC ($700 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) usando os seguintes BGE's: (1) 20 mmol L^{-1} MES/ 20 mmol L^{-1} HIS (pH=6,0); (2) 20 mmol L^{-1} TRIS/ 20 mmol L^{-1} TAPS (pH=8,3); (3) 20 mmol L^{-1} de ácido bórico com pH ajustado em 8,5 com NaOH,; (4) 20 mmol L^{-1} β – alanina com pH ajustado em 9,7 com NaOH. Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: $50 \text{ } \mu\text{m}$	85
Figura 28. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG, ASP e ASC ($700 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ cada) usando: 10 mmol L^{-1} TAPS/ 5 mmol L^{-1} NaOH (pH=8,3) ou 10 mmol L^{-1} TAPS/ 5 mmol L^{-1} KOH (pH=8,3) como BGEs. Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: $50 \text{ } \mu\text{m}$	86

Figura 29. Estudo do pH utilizando uma solução padrão contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 10 mmol L^{-1} de TAPS + NaOH com pH variando de 8,1 – 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal. 87

Figura 30. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: TAPS (10; 20; 30 mmol L^{-1}) pH = 8,7, ajustado com NaOH. Demais condições: Vide figura 27. 89

Figura 31. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões contendo (1) ARG ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASP ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), SAC ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), CAR ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e TAR ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (2) TAR ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); (3) SAC ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (4) CAR ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: TAPS (20 mmol L^{-1}) com pH = 8,7, ajustado com NaOH. Demais condições: Vide Figura 28. 90

Figura 32. Estudo do tempo de injeção utilizando uma solução padrão contendo ARG ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de TAPS + 10 mmol L^{-1} de NaOH, pH = 8,7. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 – 2,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal 91

Figura 33. Estudo da repetibilidade com dez injeções sucessivas de uma solução amostra contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de TAPS + 10 mmol L^{-1} de NaOH, pH = 8,7. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal. 93

Figura 34. Eletroferogramas obtidos a partir de soluções padrões em concentrações crescentes ARG ($80\text{-}730 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($100\text{-}750 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($80\text{-}730 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições vide figura 32. 94

Figura 35. Curvas analíticas da ARG, ASC e ASP. 94

Figura 36. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de três soluções padrões e amostras comerciais distintas contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições vide figura 30. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das características de cada técnica.....	29
Tabela 2. Faixa típica de LOD de sistemas de detecção em CE.....	43
Tabela 3. Condições otimizadas do método proposto CE-C ⁴ D.....	73
Tabela 4. Características analíticas do procedimento proposto CE-C ⁴ D (intervalo de confiança 95%).	79
Tabela 5. Determinação de DIP e NH ₄ ⁺ em amostras farmacêuticas pelo método proposto CE-C ⁴ D e pelos métodos de comparação.....	80
Tabela 6. Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (n = 3).....	81
Tabela 7. Condições otimizadas do método proposto CE-C ⁴ D.	91
Tabela 8. Características analíticas do método proposto CE-C ⁴ D (intervalo de confiança 95%).	95
Tabela 9. Determinação de ARG, ASC e ASP em amostras farmacêuticas pelo método proposto CE-C ⁴ D e os valores de recuperação de cada amostra.	96
Tabela 10. Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (n = 3).....	97

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 $F_1 = |z_i| e E$

Equação 2 $F_2 = 6 \pi \eta r_i v_{ep}$

Equação 3 $\frac{v_{ep}}{E} = \frac{z_i e}{6 \pi \eta r_i}$

Equação 4 $\mu_{ep} = \frac{z_i e}{6 \pi \eta r_i}$

Equação 5 $\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_{ep}$

Equação 6 $\mu_{eo} = -\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta}$

Equação 7 $v_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}}$

Equação 8 $v_{ap} = \frac{L_D}{T_i}$

Equação 9 $v_{ap} = v_{ef} \pm v_{eo}$

Equação 10 $V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L}$

Equação 11 $Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V \pi r^2 C t_{inj}}{L}$

LISTA DE ABREVIATURAS

- AD – Detecção amperométrica (do inglês “amperometric detection”)
- ARG – Arginina
- ASC – Ácido ascórbico
- ASP - Aspartato
- BGE - Eletrólito de corrida (do inglês “Background electrolyte ”)
- C4D - Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (do inglês, “Contactless Capacitive Coupled Conductivity Detection”)
- CAD – Conversor digital-analógico (do inglês “converter analogical digital)
- CAE - Eletroforese capilar de afinidade (do inglês “capillary affinity electrophoresis”)
- CD – Detecção condutométrica (do inglês “conductometric detection”)
- CE - Eletroforese Capilar (do inglês, “CapillaryElectrophoresis”)
- CEC - eletrocromatografia capilar (do inglês “capillary electrochromatography”)
- CGE - eletroforese capilar em gel (do inglês “capillary gel electrophoresis”)
- CIEF - focalização isoeétrica capilar (do inglês “capillary isoelectric focusing”)
- CITP - isotacoforese capilar (do inglês “capillary isotachophoresis”)
- CSE - eletroforese capilar de peneiramento (do inglês “capillary sieving electrophoresis”)
- CZE - Eletroforese capilar de zona (do inglês “Capillary zone electrophoresis ”)
- DIP – Difenidramina
- EOF - Fluxo eletrosmótico (do inglês “Electroosmotic flow ”)
- EKC - cromatografia eletrocinética (do inglês “electrokinetic chromatography”)
- ESI – Ionização eletrospray (do inglês “electrospray ionization”)
- FSCE - eletroforese capilar em solução livre (do inglês “free solution capillary electrophoresis”)

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

GC - Cromatografia gasosa (do inglês “Gas chromatography”)

HIS - Histidina

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

IHP – Plano interno de Helmholtz

LC - Cromatografia Líquida (do inglês “Liquid chromatography”)

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

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

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

MEEKC - cromatografia eletrocinética em microemulsão (do inglês “microemulsion electrokinetic chromatography”)

MES - Ácido 2-(N-morfolino) ethanosulfônico

MIP – Polímero molecularmente impresso

MS – Espectrometria de massas (do inglês “mass spectrometry”)

OHP – Plano externo de Helmholtz

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

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Análise de fármacos.....	18
1.1.1	Amônio (NH_4^+) e Difenidramina (DIP)	18
1.1.2	Arginina (ARG), ácido ascórbico (ASC) e aspartato (ASP)	19
1.3	Técnicas de eletromigração em capilares.....	22
1.4	Eletroforese Capilar: retrospectiva histórica	23
1.5	CE e outras técnicas de separação.....	28
1.6.1	Teoria da migração eletroforética	31
1.6.2	Teoria da migração eletrosmótica	33
1.6.3	O fluxo eletrosmótico (EOF).....	33
1.6.4	Fundamentos da introdução de amostras no sistema (hidrodinâmica e eletrocinética)	40
1.7	Eletroforese Capilar: sistemas de detecção	42
1.7.1	Detecção espectrofotométrica UV-Vis.....	43
1.7.2	Detecção por fluorescência.....	46
1.7.3	Detecção Amperométrica (AD)	47
1.7.4	Detecção por espectrometria de massas (MS)	47
1.7.5	Detecção Condutométrica (CD).....	48
1.7.5.1	Detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D).....	49
1.8	Análises rápidas por CE.....	53
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo Geral.....	55
2.2	Objetivos Específicos	55
3	PARTE EXPERIMENTAL	56
3.1	Reagentes e Amostras.....	56
3.2	Instrumentação para determinação de fármacos por CE- C^4D	57
3.2.1	Otimização das condições de determinação de NH_4^+ e DIP	59
3.2.2	Otimização das condições de determinação de ARG, ASC e ASP	60
3.3	Metodologias de determinação de NH_4^+ , ASC e ASP por titulação	62
3.4	Validação dos parâmetros analíticos do método proposto	63
3.4.1	Limite de detecção e quantificação	63
3.4.2	Precisão (repetibilidade).....	64
3.4.3	Exatidão (ensaios de recuperação).....	64
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66

4.1 Determinação simultânea de DIP e NH_4^+	66
4.2 Determinação simultânea de arginina (ARG), aspartato (ASP) e ácido ascórbico (ASC)	83
5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	98
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

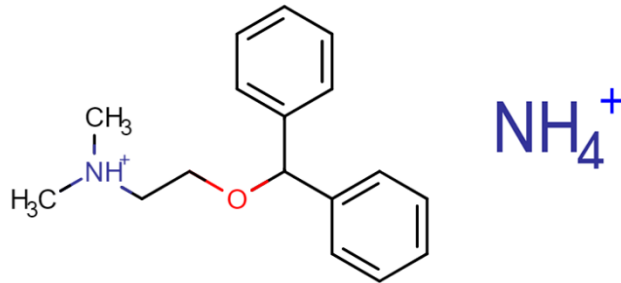
1.1 Análise de fármacos

No presente trabalho foram estudadas cinco diferentes espécies associadas em formulações farmacêuticas comerciais. Dentre elas estão a difenidramina (DIF), amônio (NH_4^+), arginina (ARG), ácido ascórbico (ASC) e ácido aspártico (ASP). A associação de princípios ativos em fármacos traz vantagens terapêuticas, porém gera novos desafios para a indústria farmacêutica em relação ao controle de qualidade. Por serem princípios ativos de medicamentos de alta demanda, bastante popular e de fácil acesso, surge assim a necessidade de desenvolvimento de métodos capazes de quantificar princípios ativos em formulações farmacêuticas compostas (associação de dois ou mais fármacos) de forma rápida, eficaz, simples e de custo reduzido.

1.1.1 Amônio (NH_4^+) e Difenidramina (DIP)

A combinação de cloreto de amônio (NH_4Cl) e DIP em formulações farmacêuticas é utilizada para o tratamento de tosse e dor de garganta. A DIP é um anti-histamínico usado para tratar os sintomas da infecção viral como tosse, nariz escorrendo e espirro [1]. O composto NH_4Cl atua como expectorante e fluidificador de secreções, auxiliando na permeabilidade das vias respiratórias. A combinação de NH_4Cl e DIP proporciona um tratamento mais eficaz para a tosse e dor de garganta do que os medicamentos contendo apenas DIP, pois a combinação desses ingredientes ativos garante simultaneamente os efeitos vasoconstritores da DIP [2,3] e propriedades expectorantes de NH_4Cl [4]. Os medicamentos que contêm DIP e NH_4^+ são populares e facilmente encontrados em farmácias comuns e de manipulação, portanto, um método para a determinação de ambos os compostos em um curto tempo de análise é altamente desejável. A Figura 1 ilustra as moléculas da DIP e do NH_4^+ .

Figura 1. Fórmulas estruturais da DIP (pKa =8,9) e NH_4^+ (pKa=9,3). FONTE: [5]



1.1.2 Arginina (ARG), ácido ascórbico (ASC) e aspartato (ASP)

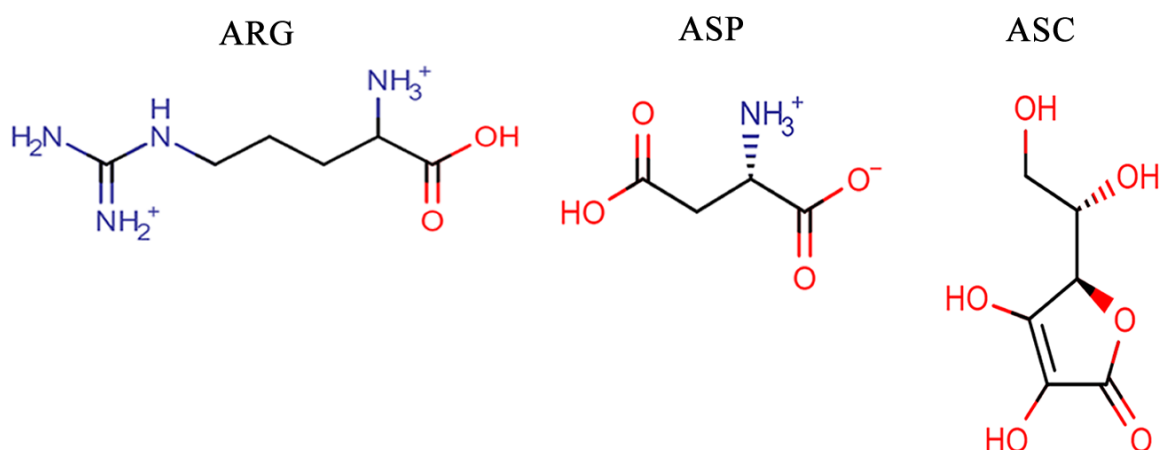
Formulações farmacêuticas que contém ARG, ASC e ASP são utilizados no tratamento da fadiga, beneficiando o desempenho físico. O aspartato de arginina é formado pela união de dois aminoácidos, cuja atividade é de fundamental importância para o metabolismo celular. O ácido ascórbico é um poderoso antioxidante utilizado em várias reações bioquímicas nas células.

A ARG atua transformando a amônia tóxica em ureia que é eliminada na urina, combatendo a fadiga muscular e mental. A produção de óxido nítrico, importante no relaxamento da parede dos vasos sanguíneos, é estimulada pela ARG, beneficiando o sistema muscular. Este aminoácido é essencial para a vida do recém-nascido até a fase adulta [6].

A principal função do ASC é a hidroxilação do colágeno, proteína que dá resistência aos ossos, dentes, tendões e paredes dos vasos sanguíneos. O ASP atua no metabolismo energético de todos os organismos vivos como intermediário no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) [7]. Durante o processo de geração de energia nas células, é liberada amônia, um produto

tóxico para o organismo que desencadeia a fadiga. A Figura 2 ilustra as moléculas dos compostos ARG, ASC e ASP.

Figura 2. Fórmulas estruturais da ARG, ASP e ASC, respectivamente. FONTE: [5]



1.1.3 Justificativa

No século XX, com o avanço da medicina, a prevenção de doenças e a inserção de produtos químicos como fármacos contribuíram para o aumento da expectativa de vida, que era em média até quarenta anos na década de 1940, e passou a ser mais de setenta anos em 2016 [8]. Tal progresso, atrelado à modernização e o aumento populacional, criaram uma geração dependente de produtos químicos, dentre esses produtos, os fármacos. A ANFARMAG (Associação Nacional de Farmacêuticos Magistrais) destaca o aumento do número de farmácias magistrais no Brasil e em outros países. Este crescimento foi motivado pela vantagem do tratamento personalizado que permite a adequação das doses, associação de fármacos e escolha farmacêutica mais adequada ao paciente [9].

A credibilidade nos produtos manipulados tem sido colocada em dúvida pela população, em parte, pela falta de um rígido controle de qualidade, sendo assim, um obstáculo para o crescimento e manutenção deste setor [10]. O controle de qualidade na Farmácia Magistral, enfrenta o desafio de os métodos da Farmacopeia não abrangerem a grande diversidade de

formulações possíveis, tendo como uma das principais dificuldades relatadas a realização de ensaios analíticos para a determinação do teor do princípio ativo [11].

1.2 Técnicas tradicionais de análise

Os métodos para a determinação de NH_4^+ baseiam-se principalmente na espectrofotometria [12–16], fluorometria [17,18], quimioluminiscência [19–21], condutometria [22,23], potenciometria [24–28], amperometria [29–37] e pelo método clássico de Kjeldahl [38], encontrado na farmacopeia brasileira. A DIP é predominantemente determinada por cromatografia líquida [39–47], a técnica mais utilizada para análises farmacêuticas e alguns métodos de eletroforese capilar [48–52]. A titulação em meio não aquoso é o método oficial encontrado na farmacopeia brasileira para doseamento da DIP [53]. No entanto, não são descritos métodos analíticos para a determinação simultânea destes compostos em formulações farmacêuticas.

Adulteração do teor de princípios ativos em medicamentos usados por seres humanos e animais é uma prática que se desenvolveu junto com a modernização e crescimento populacional. A utilização destas drogas sem essa etapa do controle de qualidade representa um risco à saúde [54]. Neste contexto, muitos métodos analíticos estão relatados na literatura para a determinação destes fármacos individualmente, entretanto, não há método para a determinação simultânea destes compostos.

Inúmeros métodos para a determinação de ARG são encontrados na literatura, sendo a titulação potenciométrica o método oficial descrito na farmacopeia americana [55]. A maioria destes métodos empregam a técnica de HPLC com detecção fluorimétrica [56–58], MS [59,60] e UV-VIS [61–64]. Outros métodos de análise de ARG são relatados na literatura utilizando CE com detecção UV-VIS [65,66] e cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa [67,68]. Para a determinação de ASP, são reportados métodos que utilizam biosensor

amperométrico [7], HPLC (através da derivatização fluorescente [69–71]), CE (através da derivatização [72] e utilizando um detector fluorimétrico induzido à laser [73]) e titulação ácido-base como método oficial de acordo com a farmacopeia americana [74].

O ASC vêm sendo consumido há várias décadas, assim, vários estudos, bem como artigos de revisão são encontrados na literatura. Em produtos alimentícios, são reportados métodos de determinação do ASC de 1976 até 1981 [75], bem como de 1986 até 1992 [76], entre outros. Atualmente, para essa vitamina, há referências sobre as vantagens da determinação de ASC por injeção em fluxo [77] e CE [78] bem como as vantagens e desvantagens do uso de HPLC para determinação de ASC e seu produto de degradação, o ácido dehidroascórbico [79] e ainda inúmeros métodos eletroquímicos para determinação da vitamina C [80]. A iodometria é o método oficial encontrado na farmacopeia brasileira para doseamento do ASC [53].

1.3 Técnicas de eletromigração em capilares

A eletroforese capilar de zona (CZE) é o modo de separação mais utilizado em eletroforese, todavia, este modo de separação possui algumas limitações em certos tipos de análises. Portanto, algumas modificações, tendo CZE como base, foram feitas a fim de atender novos desafios e contornar antigas limitações. As modificações propostas deram origem a novas técnicas de eletromigração como eletroforese capilar de afinidade (CAE, “capillary affinity electrophoresis”), eletroforese capilar de peneiramento (CSE, “capillary sieving electrophoresis”), eletroforese capilar em gel (CGE, “capillary gel electrophoresis”), focalização isoeétrica capilar (CIEF, “capillary isoelectric focusing”), isotacoforese capilar (CITP, “capillary isotachophoresis”), cromatografia eletrocinética (EKC, “electrokinetic chromatography”), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, “micellar electrokinetic chromatography”), cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC, “microemulsion

electrokinetic chromatography”), eletrocromatografia capilar (CEC, “capillary electrochromatography”), eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE, “nonaqueous capillary electrophoresis”) e microchip [81–83].

O modo de separação CZE também é conhecido como eletroforese capilar em solução livre (FSCE, “free solution capillary electrophoresis”). Esta técnica consiste na injeção da amostra dentro da coluna capilar previamente preenchida com o BGE. O potencial aplicado gera um campo elétrico, o qual promove a migração dos analitos em zonas distintas e velocidades constantes, porém diferenciadas. O desdobramento de otimização da técnica leva em consideração a adição de aditivos ou complexantes aos eletrólitos aquosos, com a finalidade de interagir com os analitos de forma seletiva, alterando suas mobilidades para alcançar maior eficiência de separação. Os outros tipos de modalidades eletroforéticas são muito bem descritas e detalhadas na literatura [81,82,84,85].

1.4 Eletroforese Capilar: retrospectiva histórica

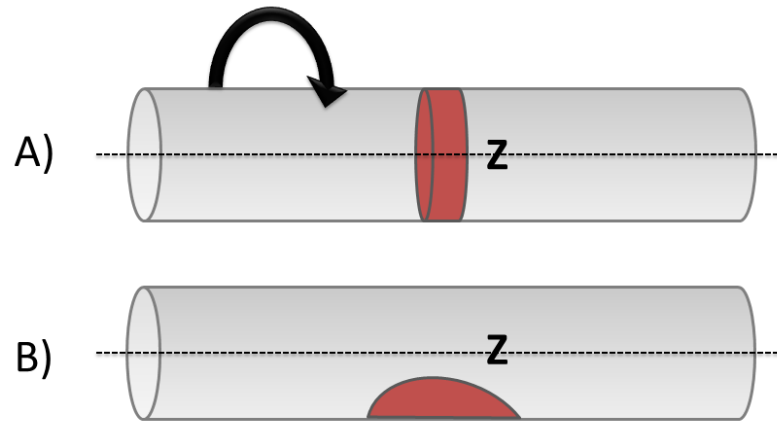
A eletroforese é uma técnica de separação introduzida no século XX, por Arne Tiselius, em meio à necessidade de estudo de proteínas em soro recém descobertas na época. Este fenômeno consiste na migração de íons solvatados ou espécies ionizáveis, quando estas estão dissolvidas ou suspensas em um eletrólito, a partir da aplicação de um campo elétrico. Arne Tiselus, pela sua pesquisa com proteínas em soro ganhou o prêmio Nobel de química em 1948 [86], seu trabalho com moléculas biológicas foi de grande impacto para o desenvolvimento da bioquímica como uma ciência exata [87].

Esta técnica era bastante limitada devido à instabilidade do equipamento, pelos efeitos de difusão, aquecimentos gerados pelo campo elétrico, além da separação incompleta dos componentes da amostra, ou seja, apenas uma parte da substância de eluição mais rápida e uma

parte da substância de eluição mais lenta eram retiradas de forma pura. Estes efeitos foram minimizados a partir da introdução de um suporte (gel ou papel), o que reduziu o efeito da difusão e ajudou a conter o movimento livre dos analitos em solução. Apesar da inclusão de um suporte, qualquer tentativa de alcançar uma separação de zona por esta técnica de eletroforese seria frustrada pelo início da convecção [88]. A convecção ocorre devido à má dissipação de calor gerado pelo efeito Joule na eletroforese, pois somente as extremidades dissipam o calor, assim cria-se um gradiente de temperatura que leva à um gradiente de densidade e, por fim, à convecção. De modo teórico, a inclusão de um aparato anti-convecção na célula de separação pode modificar a eletroforese de fronteira móvel em eletroforese de zona, o que seria de grande valor em trabalhos de identificação e quantificação [88].

Em 1967, Hjerten introduziu uma alternativa para os problemas de convecção, ele não conseguiu acabar com este fenômeno, mas suprimiu o movimento convectivo para uma órbita periódica da substância. As separações eletroforéticas ocorreriam em um tubo de quartzo, com o diâmetro interno na ordem de milímetros, sob rotação, a qual estabilizaria a zona [88]. Devido à dificuldade de dissipação do calor, a densidade varia ao longo da seção transversal de uma zona, assim sob a influência da gravidade, a substância pode ter um deslocamento, com o arranjo experimental proposto, a rotação do tubo, a substância estará submetida ao movimento periódico de ida e volta em relação à parede do tubo, sendo possível tornar a zona homogênea, inibindo a convecção. A Figura 3 ilustra um tubo de eletroforese em seu eixo longitudinal onde em (a) a zona é estabilizada pela rotação do tubo e em (b) a rotação é interrompida e a zona é espalhada rapidamente [88].

Figura 3. Ilustração do princípio envolvido na estabilização de zonas (Z) por rotação do tubo de eletroforese. Se a rotação for parada, a forma da zona em (A) se espalhará como mostrado em (B).



A convecção não era o único inconveniente promovido pelo efeito Joule na eletroforese, o aquecimento da solução também levava a degradação de amostras termicamente instáveis, comprometendo a análise. Logo se percebeu que a redução do diâmetro interno dos tubos da eletroforese atuaria em vantagem para uma dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica [89]. A primeira publicação sobre separações em eletroforese capilar de zona (CZE) foi em 1979, por Mikkers *et al.*, em que foi possível a separação de 16 ânions relativamente pequenos. A análise ocorreu em um capilar de Teflon, 200 μm de d.i., com detecção de gradiente de potencial [90].

Em 1963, com o objetivo de adaptar a eletroforese para a sua inserção à rotina laboratorial, ou seja, com a finalidade de obter uma técnica economicamente barata e prática para a rotina de análises de amostras, Graham e Grunbaum criaram o método para fracionamento de proteínas e enzimas utilizando como suporte o acetato de celulose. Com esta inovação, a técnica permite alto grau de separação e quantificação das frações proteicas, além de ser caracterizada no meio científico como simples e barata. Em 1987, o suporte de celulose como objeto de pesquisas, foi melhorado, tendo os poros gelatinizados, conhecido atualmente como Cellogel [91].

Com os avanços instrumentais na eletroforese foi possível a inserção de colunas capilares com diâmetros menores. A implementação, pela primeira vez, de capilares de sílica fundida com diâmetros internos extremamente pequenos em eletroforese foi relatada em publicações de Jorgenson e Lukacs em 1981. Os trabalhos publicados nas revistas *Analytical Chemistry* [92] e *Science* [93] são marcados pelo o uso de colunas capilares com d.i. de 75 μm . Devido a inserção de capilares com um pequeno diâmetro interno em Eletroforese Capilar (CE, do inglês “*Capillary Electrophoresis*”) passou-se a ter uma maior área superficial em relação ao volume do capilar, facilitando a dissipação do calor e sendo possível a aplicação de altas voltagens (chegando à 30 kV), o que aumentou drasticamente a frequência analítica e a eficiência da separação, principais vantagens que tornaram CE tão atrativa nos dias atuais.

Apesar dos benefícios causados pela inserção do capilar de sílica fundida, os trabalhos de Jorgenson e Lukacs apresentaram resultados prejudicados pela atração eletrostática entre a parede do capilar carregada negativamente e pelas proteínas analisadas carregadas positivamente, obtendo picos com um forte efeito de cauda. Em vista destas limitações em relação à análise de espécies catiônicas Lauer e Mc Manigill, em 1986, publicaram estudos na separação de proteínas a partir do princípio de repulsão (proteínas e parede do capilar com cargas iguais), além de discutir brevemente o fenômeno do fluxo eletrosmótico (EOF do inglês *Electroosmotic Flow*), sua magnitude e possível controle [94].

Ao longo dos anos, a CE se tornou objeto de diversos estudos, sendo a base para um grande número de artigos publicados, explorando tanto a sua aplicabilidade quanto inovações em seus aspectos instrumentais. Como no trabalho de Terabe *et al.*, em 1984 [84], com a introdução da cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, do inglês “*Micellar Electrokinetic Chromatography*”), que consiste na adição de agentes tensoativos iônicos ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases (BGE e micelas), e como nos trabalhos de Knox e Grant, em 1987 [95] e 1991 [96], a partir de estudos da eletrocromatografia

capilar CEC (do inglês "capillary electrochromatography") onde o método de separação ocorre a partir da aplicação de uma diferença de potencial, ao invés da pressão, para a eluição da fase móvel por uma coluna recheada. Assim a separação e a análise de espécies neutras por CE tornaram-se realidade.

Em 1987, foi construído o primeiro equipamento de interesse comercial de CE, por se tratar de uma instrumentação relativamente simples, muitos grupos foram levados a construir seu próprio equipamento [97–99]. Ideias e perspectivas futuras começaram a rodear essa nova técnica, aplicações para as mais variadas substâncias e matrizes fazem parte do cenário atual da pesquisa.

As separações em micro canais vêm se tornando objeto de interesse da comunidade científica desde seu aparecimento, no final do século XX. O uso de micro canais como o μ chip integra a vantagem de consumo de volumes reduzidos de amostras e reagentes, além de associar vários processos como pré-concentração, derivatização, diluição, mistura, separação e detecção em um único substrato [100]. Gavin e Ewing [101] publicaram, em 1997, um trabalho que relata o uso de um substrato de vidro com 100 eletrodos de platina construídos individualmente, esse sistema de separação foi denominado eletroforese em canal. A fabricação de μ chips foi primeiramente proposta por Wooley e colaboradores [102], em 1998, este trabalho retrata a separação de três neurotransmissores em 100 s.

A implementação instrumental eletroforética é o tema de teses de pesquisadores [103–105] que acreditam no potencial da mesma, na força que ela possui, não para competir, mas para complementar o time de técnicas analíticas de separação a serviço da sociedade.

1.5 CE e outras técnicas de separação

CE é adequada para a separação e determinação de componentes amostrais (ionizados ou parcialmente ionizados) de forma similar à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*High-Performance Liquid Chromatography*”), cromatografia iônica e eletroforese em placas de gel, tendo aplicações bioquímicas, clínicas, ambientais, alimentares, forenses e farmacêuticas [66,106,107], englobando compostos orgânicos iônicos e não iônicos, inorgânicos iônicos e não iônicos e macromoléculas (tais como proteínas e oligonucleotídeos e compostos quirais) [108–110]. Outras vantagens que a tornam tão atrativa são [111]:

- Possibilidade de automação;
- O pré-tratamento das amostras as vezes não é necessário;
- Pequenas quantidades de padrão e amostra, volumes tipicamente da ordem de 1 a 10 nL, possibilitando a determinação de amostras com disponibilidade limitada;
- O principal solvente utilizado é a água, se enquadrando bem nos parâmetros da Química Verde.
- Possibilidade de injeção e detecção em fluxo;
- Baixo custo do equipamento e manutenção;
- Tempo de análise reduzido quando comparada às técnicas clássicas de separação.

A CE oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc), pois a alta resistência do capilar comumente usado (tubos de sílica fundida externamente revestidos com poliimida) possibilita o estabelecimento de campos elétricos de valores elevados ($100\text{--}1000\text{ V cm}^{-1}$), resultando em análises com separações de alta eficiência e tempos de análise apreciavelmente curtos [85].

Comparado à HPLC, a CE se sobressai em questões de eficiência e tempo de análise. Análises cromatográficas em uma coluna empacotada estão sob a ação de três mecanismos que alargam o pico: caminhos múltiplos de fluxo, difusão longitudinal e velocidade finita de

transferência de massa. A coluna capilar possui apenas 1 mecanismo dos 3 relatados como fonte possível do alargamento dos picos. Os caminhos múltiplos de fluxo são eliminados e, assim, a altura do prato é reduzida, consequentemente aumentando o número de pratos, o que resulta em uma melhor resolução. Como em CE não existe fase estacionária, não há a presença do termo de transferência de massa, proveniente do tempo finito necessário para o soluto atingir o equilíbrio entre as fases móvel e estacionária, assim, a altura do prato é reduzida mais uma vez contribuindo para uma análise mais eficiente. A única fonte possível para causar alargamento dos picos, em condições ideais, é a difusão longitudinal [112].

A Tabela 1 compara, de forma geral, as características de desempenho das técnicas HPLC, CE e eletroforese em placas de gel.

Tabela 1. Comparação das características de desempenho das eletroforeses capilar, em gel e HPLC.

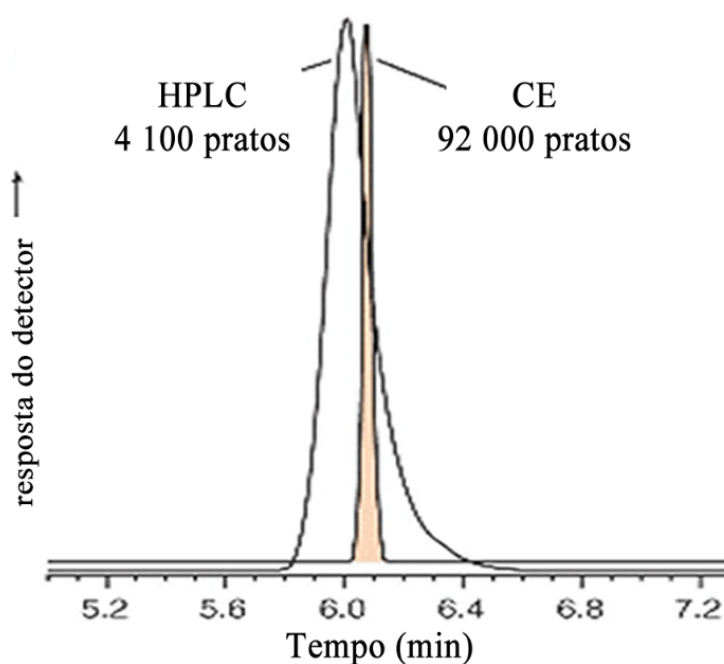
	Placas de Gel	HPLC	CE
Velocidade	baixa	moderado	alta
Custo do equipamento	baixo	alto	moderado
Custo operacional	baixo	alto	baixo
Detectabilidade			
• Concentração	ruim	excelente	ruim
• Massa	ruim	ruim	excelente
Eficiência	alta	moderada	alta
Automação	pouca	sim	sim
Quantificação	difícil	fácil	fácil
Precisão	ruim	excelente	boa
Consumo de reagentes	baixo	alto	mínimo
Robustez	boa	excelente	boa
Separações			
• DNA	excelente	boa	excelente
• Proteínas	excelente	boa	excelente

Adaptado de [113]

A Figura 4 compara os picos obtidos pelas técnicas CE e HPLC na análise de um álcool, em que é possível observar um desempenho superior da CE em comparação à cromatografia líquida de alta eficiência. O número de pratos teóricos da eletroforese capilar fica na faixa de 50.000 a 5000.000.

Figura 4. Comparação das larguras dos picos do álcool benzílico ($C_6H_5CH_2OH$) na CE e na HPLC.

FONTE [112]:



A cromatografia por troca iônica é uma opção para a separação de espécies iônicas de uma forma geral, porém, possui a desvantagem de ser menos eficiente que outras técnicas de separação, sendo muitas vezes preferível o emprego de CE ou a neutralização da molécula e separação por cromatografia líquida por partição [114]. Como qualquer técnica, CE possui desvantagens. Em questões de sensibilidade e robustez, a HPLC tem um desempenho melhor [115]. No caso particular da CE equipada com um detector C^4D , os limites de detecção (LOD) estão na ordem de 10^{-5} a 10^{-6} mol L^{-1} , o que exclui a possibilidade de analisar elementos traços, limitando a variedade de matrizes de aplicação da mesma [111].

1.6 Fundamentos Teóricos

Neste tópico são colocados em discussão os fundamentos teóricos que sustentam as separações eletroforéticas de zona ou solução livre equipadas com capilares de sílica fundida.

1.6.1 Teoria da migração eletroforética

A eletroforese é uma técnica de separação que consiste na migração de um íon e sua esfera iônica, sob o efeito de um elevado campo elétrico (E). O íon é acelerado até que a força de atrito começa a atuar contrabalanceando a força elétrica, assim o íon entra em um movimento constante, com a velocidade final adquirida. A força de atrito pode aumentar com o tamanho do íon (raio hidratado) e com a viscosidade do eletrólito suporte. A força elétrica (F_1) é calculada pelo produto da carga do íon (z_i), a carga elementar (e) e o campo elétrico [87]:

Equação 1
$$F_1 = |z_i| e E$$

Pela lei de Stokes, a força de atrito (F_2) para íons de forma esférica pode ser aproximada a:

Equação 2
$$F_2 = 6 \pi \eta r_i v_{ep}$$

Onde η é a viscosidade do meio, r_i é o raio iônico efetivo e v_{ep} a velocidade eletroforética. Quando o íon cumpre sua velocidade final, a resultante de forças é nula, igualando a eq. 1 à eq. 2. [87]

$$F_1 = F_2$$

$$|z_i| e E = 6 \pi \eta r_i v_{ep}$$

Equação 3

$$\frac{v_{ep}}{E} = \frac{z_i e}{6 \pi \eta r_i}$$

Sabendo que a mobilidade eletroforética (μ_{ep}) corresponde à v_{ep} dividida pela magnitude de E, substituindo na eq. 3, têm-se:

Equação 4

$$\mu_{ep} = \frac{z_i e}{6 \pi \eta r_i}$$

Assim, o conceito de mobilidade eletroforética rege a migração de espécies eletricamente carregadas. Os compostos em solução submetidos à análise por CE podem se encontrar dentro de um equilíbrio (moléculas não ionizadas junto a moléculas com um valor particular de mobilidade) dependente das condições da solução, como viscosidade, pH, e adição de agentes complexantes e/ou solventes orgânicos. A mobilidade eletroforética efetiva (μ_{ef}) retrata a migração de eletrólitos fracos. A μ_{ef} pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, em que qualquer composto, sob condições de equilíbrio, parcialmente ionizado, se movimenta em um campo elétrico como um soluto singular, como uma única banda. Neste caso, a mobilidade μ_{ef} é dependente das mobilidades eletroforéticas (μ_{ep}) e dos graus de dissociação (α) das n espécies (Eq. 5) [87].

Equação 5

$$\mu_{ef} = \sum_{j=1}^n \alpha_j \mu_{ep}$$

O equilíbrio de cada espécie em solução é dependente da sua constante de dissociação do soluto (pKa) em um intervalo de pH definido, no qual esta constante define a predominância das espécies. A escolha do tampão de corrida com o pH adequado pode muitas vezes ser

fundamental para a separação de espécies com mobilidades eletroforéticas semelhantes, em que a modificação dos valores de α irá definir a mobilidade eletroforética efetiva.

1.6.2 Teoria da migração eletrosmótica

A aplicação de um campo elétrico nos estudos por CE gera no interior da sílica uma dupla camada elétrica que inicia o fluxo eletrosmótico (EOF do inglês *Electroosmotic Flow*). A magnitude deste fluxo é dependente da mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}), a qual é constituída por várias constantes, tais como permitividade da solução (ϵ_r), a viscosidade dinâmica da solução (η), a permitividade do vácuo (ϵ_0) e o potencial eletrocinético (ou zeta) (ζ), ao aplicar um potencial têm-se a velocidade eletrosmótica (v_{eo}): [81,82]

Equação 6
$$\mu_{eo} = -\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta}$$

Equação 7
$$v_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}}$$

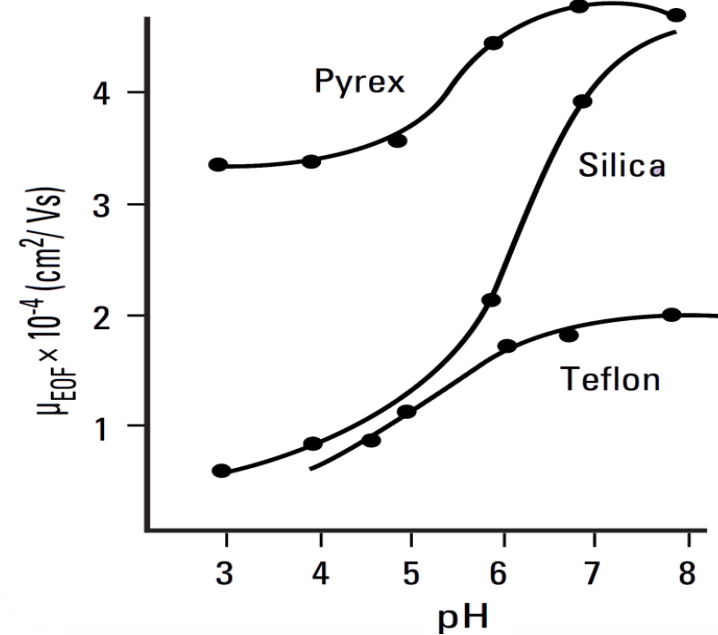
Em técnicas de eletromigração capilar, a v_{eo} pode ser calculada a partir da Eq. 7, sendo L_{ef} o comprimento efetivo do capilar e t_{eo} o tempo de migração eletrosmótico, no qual esta velocidade é positiva, por convenção, no sentido da extremidade da injeção da amostra para a extremidade de detecção do capilar, caso contrário, passará a ter um valor negativo. [81]

1.6.3 O fluxo eletrosmótico (EOF)

O EOF é um evento que influencia a migração de espécies, onde a sílica fundida, o material comumente utilizado na fabricação de capilares para CE, formará uma dupla camada

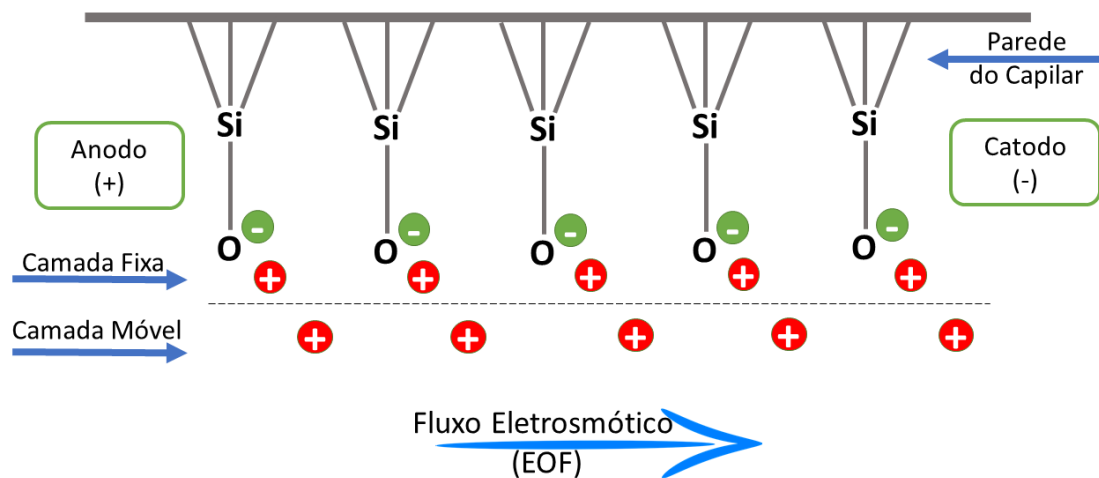
elétrica devido a presença de grupos silanóis na parede interna do capilar. Quando a solução no interior do capilar apresentar um pH acima de 3, os grupos silanóis serão ionizados (desprotonação), sendo que a ionização é total em pH acima de 7,5-8,0, como mostrado na Figura 5.

Figura 5. Efeito do pH na mobilidade eletrosmótica em capilares de diferentes materiais. FONTE: [116]



As espécies do tampão de corrida (BGE, do inglês “*background electrolyte*”) provedoras de cargas positivas serão fortemente atraídas pela superfície do capilar devido a forças eletrostáticas ou por forças de coesão (adsorção específica), criando assim uma primeira dupla camada elétrica, uma camada fixa. O centro destes íons definirá um plano, conhecido como plano interno de Helmholtz (IHP), como pode ser observado na Figura 6.

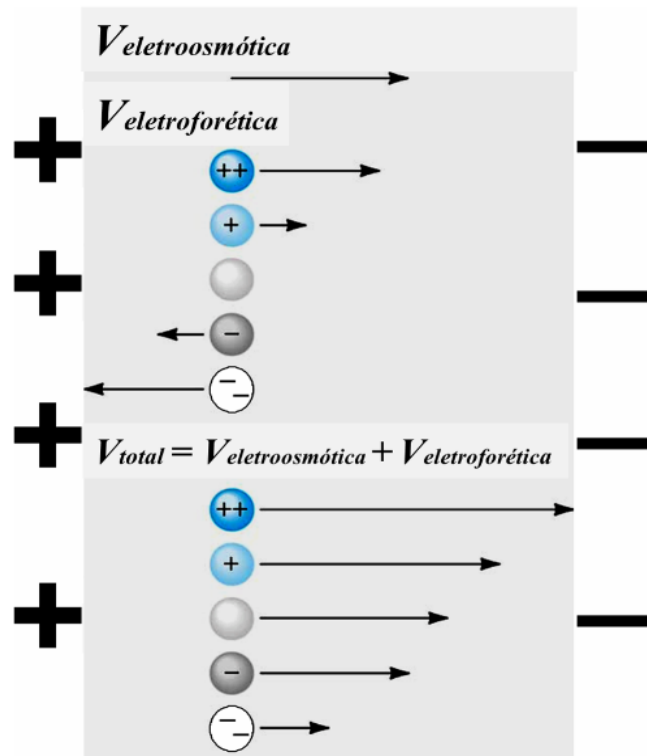
Figura 6. Representação da interface do capilar com a aplicação de um potencial.



Uma segunda camada é criada a partir da presença de íons hidratados, os quais se aproximam da superfície a uma distância correspondente a seus raios de hidratação. Estes íons são fracamente ligados a parede interna do capilar e a interação é dependente das propriedades físicas da espécie (adsorção não-específica). O plano definido pelo centro dos íons hidratados é denominado plano externo de Helmholtz (OHP). A concentração de íons de carga oposta à superfície é inversamente proporcional à distância da mesma, e eventualmente aproxima-se do valor de concentração dos íons na solução, esta região é conhecida como camada difusa da dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado tangencialmente à superfície (potencial de separação aplicado em CE), forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, o qual provoca um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Enquanto ocorre a migração dos íons do BGE, ocorre o transporte de moléculas de água, induzindo o fluxo de solução como um todo, conhecido como EOF. Com a ação do EOF, o resultado é a migração tanto de cátions quanto de ânions em um único sentido. Por resultante dos vetores da velocidade de migração pode-se afirmar que a velocidade de migração líquida dos cátions $[\mu_{eo} + (+\mu_{ef})]$ é maior comparada a velocidade de migração líquida de ânions $[\mu_{eo} +$

$(-\mu_{ef})]$ em direção ao cátodo (μ_{eo} normal – capilar de sílica sem modificação), como pode ser observado na Figura 7 [85,87].

Figura 7. Esquema ilustrativo das grandezas vetoriais V_{eo} e V_{ep} .

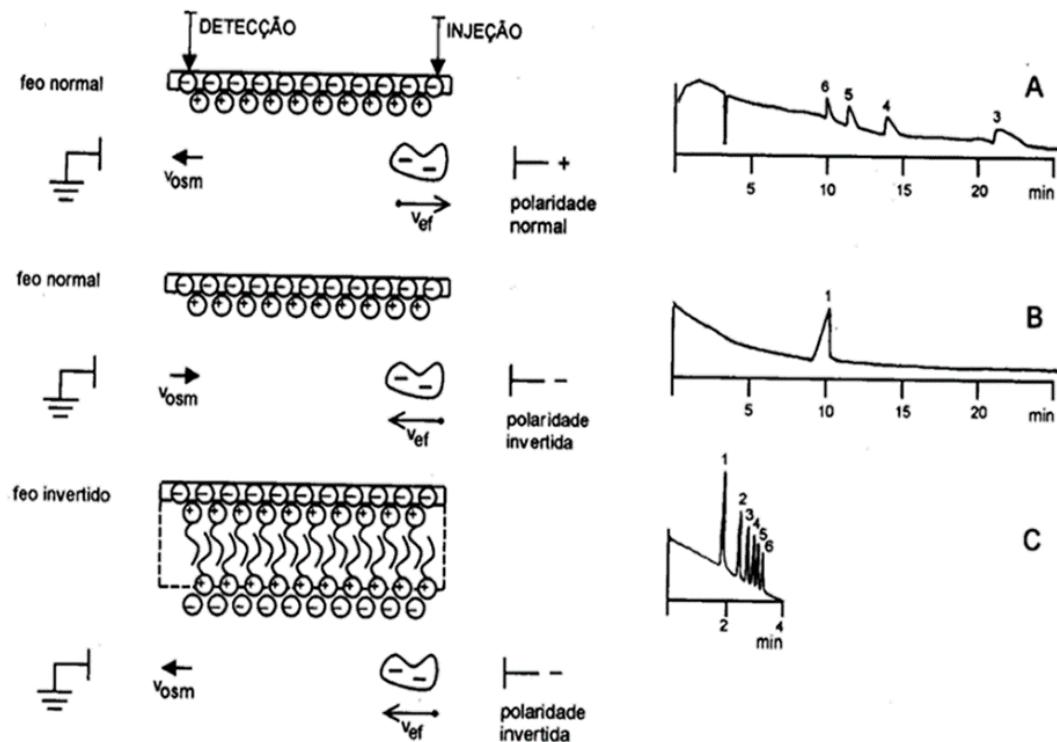


Quando as espécies de interesse são apenas ânions com altas mobilidades eletroforéticas, é possível realizar a análise apenas com a inversão da polaridade, em que o íon migrará contra o EOF em direção ao polo positivo (ânions podem ter uma velocidade semelhante ou até mais rápida que o EOF). Neste caso, a desvantagem é um tempo de análise mais longo e picos assimétricos [117]. Para contornar esta limitação, há a opção de inversão do sentido do EOF, como resultado, análises de ânions [$\mu_{eo} + (+\mu_{ef})$] muito mais rápidas e com a obtenção de picos simétricos são possíveis.

A primeira inversão do EOF ocorreu a partir do uso de surfactantes catiônicos, em 1956 por Fuerstenau [118]. Tensoativos catiônicos foram adicionados aos BGEs com a finalidade de inversão do EOF, os mais comuns são derivados de sais quaternários de amônio de cadeia longa

como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, do inglês “cetyltrimethylammonium bromide”). O processo de inversão ocorre da seguinte forma, com a desprotonação dos grupos silanóis ($\text{pH} > 3$), a parede do capilar encontra-se carregada negativamente, ao adicionar o inversor (surfactante catiônico), uma camada de semi-micelas é adsorvida fortemente à superfície interna do capilar, carregando a parede com cargas positivas. As cargas positivas das semi-micelas irão atrair os ânions do BGE de forma a estruturar a dupla camada elétrica que se moverá em direção ao ânodo (polo positivo) assim que o campo elétrico for acionado. A Figura 8 ilustra os três mecanismos mencionados de separação de ânions [117].

Figura 8. Ilustração dos possíveis mecanismos de separação de ânions por eletroforese capilar sendo (A) EOF e polaridade normal; (B) EOF normal e polaridade invertida e, (C) Inversão de EOF e polaridade invertida. FONTE: [117]



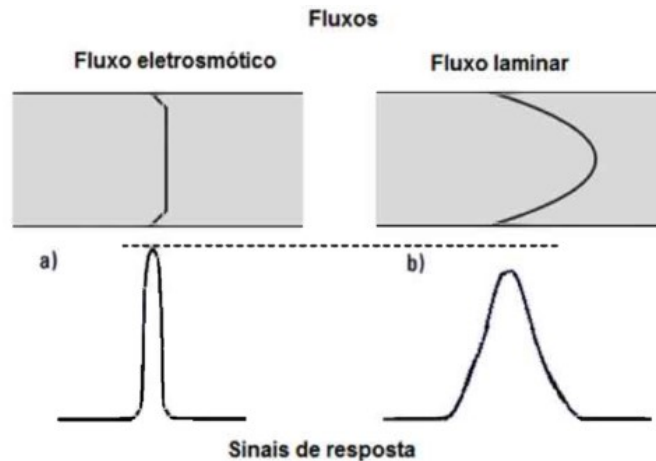
A migração das espécies em questão, quando na presença do EOF, não será dependente apenas das suas próprias modalidades, pois as mesmas serão somadas ou subtraídas à modalidade do EOF. Portanto, o tempo (t_i) que as espécies levam para percorrer um comprimento de capilar efetivo (L_D) é determinado pela sua velocidade aparente (v_{ap}), como definido na Equação 8, a qual pode ser calculada também pela soma das suas velocidades eletroforéticas efetivas (v_{ef}) à velocidade do EOF (v_{eo}), como demonstrada na Equação 9, sendo que, se o EOF possuir o mesmo sentido de v_{ef} , o sinal será positivo, e negativo se o EOF estiver em sentido oposto [87,119].

Equação 8
$$v_{ap} = \frac{L_D}{T_i}$$

Equação 9
$$v_{ap} = v_{ef} \pm v_{eo}$$

A alta eficiência desse sistema está vinculada ao perfil radial da v_{eo} , onde distâncias maiores que a definida pelo plano de cisalhamento, com $v_{eo} = 0$, têm-se uma velocidade que aumenta de forma acelerada até a distância da espessura da camada difusa, após essa distância, a velocidade assume um valor constante. Nos experimentos de eletromigração em capilares, a espessura da camada difusa é muito menor que o raio do capilar, assim, o perfil de velocidade radial aparece como linear, ou seja, o fluxo é uniforme na seção transversal do capilar. Assim, o EOF permite altas resoluções, devido à menor dispersão de banda em comparação às técnicas que empregam pressão para bombeamento de fluidos (Figura 9), onde existem tensões de cisalhamento entre as camadas adjacentes causando um perfil parabólico da velocidade de fluxo.

Figura 9. Perfis dos fluxos eletrosmótico, típico de CE (a) e laminar, próprio de HPLC (b), e suas correspondentes zonas de amostras. FONTE [116]:



O desempenho do sistema CE pode ser afetado por alguns fatores, como [120]:

- pH do BGE: Influência direta na desprotonação dos grupos silanóis da parede interna do capilar, assim afetando a magnitude do EOF. Também influencia diretamente a mobilidade aparente de ácidos e bases fracas.
- Campo Elétrico: Intercede pela V_{eo} , eficiência, resolução e temperatura; afeta inversamente o tempo de análise.
- Força iônica: Interfere na estabilidade dos íons na dupla camada elétrica afetando inversamente o ζ e o EOF, devido a constrição da mesma; aumento de íons na solução eleva o sinal da corrente e conseqüentemente um maior efeito Joule.
- Temperatura: Variação da viscosidade da solução influenciando o EOF e comprometendo a repetibilidade do sistema.
- Surfactantes: Surfactantes aniônicos podem aumentar a v_{eo} enquanto os surfactantes catiônicos podem reduzir a v_{eo} , ou mesmo inverter o sentido do EOF.
- Polímeros neutros hidrofílicos: Aumentam a viscosidade e recobrem a parede do capilar (redução de suas cargas), comprometendo o EOF.

1.6.4 Fundamentos da introdução de amostras no sistema (hidrodinâmica e eletrocinética)

A técnica de introdução da amostra se reflete na análise quantitativa, pois irá influenciar a reprodutibilidade da área do pico, ou a altura. Em CE, as amostras são introduzidas a partir de métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos. A introdução da amostra de forma hidrodinâmica consiste na formação de um gradiente de pressão estabelecido entre o reservatório do eletrólito e o capilar que pode ser formado por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, sendo que o reservatório de injeção seja elevado em relação ao outro, assim, a amostra será introduzida por sifonação. Já na injeção eletrocinética é estabelecido um gradiente de potencial ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo conhecido [121].

A injeção hidrodinâmica irá introduzir no capilar uma alíquota que representa o soluto encontrado na amostra, o volume de injeção (nL) é influenciado pelo tempo de injeção, as dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. O volume de injeção (V_{inj}) pode ser calculado através da Equação 10 [121].

Equação 10

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L}$$

ΔP = pressão aplicada no capilar

d = diâmetro interno do capilar

t_{inj} = tempo em que a pressão é aplicada

η = viscosidade da amostra

L = comprimento total do capilar.

Na injeção eletrocinética, a quantidade de material injetado é dependente da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e meio condutor, assim, como a

magnitude do fluxo eletrosmótico, esse tipo de injeção é vantajoso quando utilizada em amostras mais viscosas. A quantidade injetada (Q) pode ser calculada através da Equação 11 [87].

Equação 11

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V \pi r^2 C t_{inj}}{L}$$

μ_{ap} = mobilidade aparente,

μ_{eo} = mobilidade eletrosmótica.

V = voltagem

r = raio interno do capilar

C = concentração do analito

t_{inj} = tempo de injeção

L = comprimento total do capilar.

Comparando os dois tipos de introdução, a hidrodinâmica ocorre a partir da transferência de volume, enquanto na introdução eletrocinética, a quantidade de amostra inserida no capilar será dependente da mobilidade eletrosmótica e dos íons ou espécies ionizáveis presentes, o que pode acarretar numa discriminação entre as espécies iônicas de maior e menor mobilidade, sendo um problema quando espécies de menor mobilidade possuem concentrações próximas ao limite de detecção. A introdução eletrocinética normalmente requer o uso de um padrão interno para corrigir variações na injeção de amostras, entretanto esse tipo de introdução é preferível quando se trata de análise de amostras com matrizes complexas, ou seja, a discriminação de espécies inseridas no equipamento pode atuar como vantagem nesses casos [87].

1.7 Eletroforese Capilar: sistemas de detecção

A escolha de um detector adequado deve partir de alguns critérios que influenciam a análise como sensibilidade, seletividade, intervalo linear de concentração e ruído. O detector deve fornecer uma resposta reprodutível e associada à quantidade ou concentração do soluto investigado.

A detecção em CE é um grande desafio, devido à pequena dimensão do capilar. Embora para CE seja necessário um volume de amostra na escala de nanolitros, não se trata de uma técnica de análise de “traços”. Diante de um bom desempenho do sistema de detecção é possível a determinação das espécies de interesse em diferentes condições de análise preservando uma boa razão sinal-ruído (SNR, do inglês “signal-noise ratio”) e baixos limites de detecção (LOD, do inglês “limit of detection”) e quantificação (LOQ, do inglês “limit of quantitation”) [121].

A implementação da técnica com novos sistemas de detecção é uma área de pesquisa com um rápido avanço tecnológico devido à facilidade de alguns detectores, geralmente os utilizados em cromatografia líquida, em adaptarem à eletroforese capilar, nas quais pequenas modificações nos detectores são suficientes para a acomodação do capilar de sílica fundida [122].

Os detectores podem ser universais ou seletivos, o sinal produzido por detectores universais será referente a diferença entre alguma propriedade do soluto em relação ao BGE. Assim, a resposta do detector não dependerá das características do soluto, mas sim da diferença entre as características do soluto e do BGE. Tem-se como detectores universais os de espectrometria de massas e condutividade, como exemplo [121].

Detectores universais possuem a desvantagem de apresentarem uma menor sensibilidade e intervalo dinâmico, enquanto os detectores seletivos são mais sensíveis, pois medem uma propriedade particular do soluto, sendo assim, uma detecção limitada aos solutos que possuem

a referida propriedade. Têm-se como detectores específicos os fotodetectores (detecção direta), e os detectores amperométricos, como exemplo. O uso de detectores específicos é indicado em casos onde a matriz da amostra é complexa. A Tabela 2 relaciona alguns sistemas de detecção utilizados em CE com seus respectivos limites de detecção.

Tabela 2. Faixa típica de detectabilidade de sistemas de detecção em CE.

Modo de Detecção	(massa) / mols	(concentração) / mol L⁻¹
Absorção no UV-vis	10^{-12} - 10^{-15}	10^{-5} - 10^{-7}
Fluorescência	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}
Fluorescência (laser)	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-9} - 10^{-12}
Amperometria	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-11}
Condutividade	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-7}
Espectrometria de Massas	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}
UV, fluorescência e amperometria (indireta)	10-100 vezes menor que o modo direto	—
Adaptado de [121]		

1.7.1 Detecção espectrofotométrica UV-Vis

A detecção pela absorção UV-Vis é o método mais utilizado em sistemas CE, sendo que possui uma natureza de detecção seletiva, onde um comprimento de onda é selecionado a partir do grau de absortividade do analito de interesse. Quando o analito de interesse não é um cromóforo é possível adicionar um cromóforo no BGE o qual será constantemente monitorado e os analitos que não absorvem serão detectados indiretamente. [123]

A alta eficiência observada em CE, deve-se, em parte, à detecção direta no capilar. Como a janela óptica está diretamente no capilar, não há alargamento da zona devido ao volume morto ou mistura de componentes.

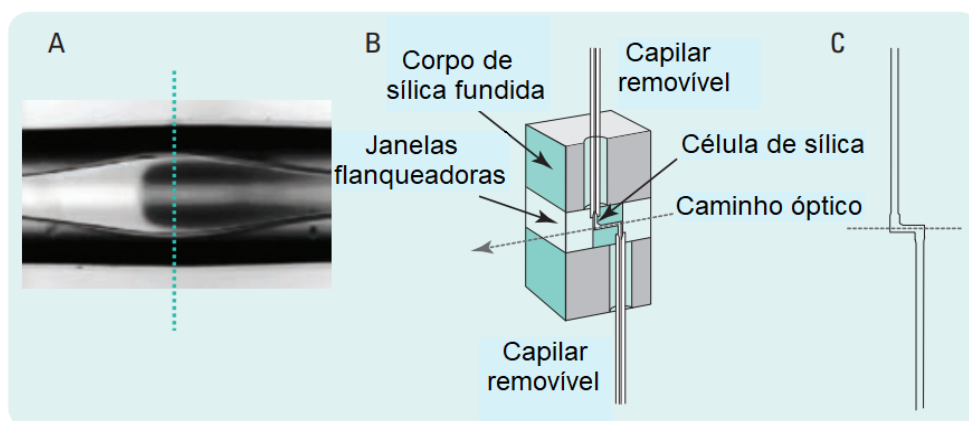
Em questões de sensibilidade, o detector UV-vis é dependente do caminho óptico, onde pode ser melhorado a partir do aumento do diâmetro interno do capilar. Isso é possível pois com o aumento do caminho óptico há uma elevação do sinal analítico em relação à determinada concentração. Este tipo de abordagem é limitado, pois com o aumento do diâmetro do capilar ocorrerá aquecimento dentro do capilar. Em meio ao desafio foram criados capilares especiais que são usados para ampliar o caminho óptico sem aumentar seu raio interno. Três dos projetos são expostos a seguir:

- Célula Bolha: A Figura 10A ilustra a sessão longitudinal de uma célula bolha, esse capilar oferece um método exclusivo que estende o caminho óptico sem interferir na eficiência de separação. Este tipo de capilar possui uma região expandida (bolha) com resistência elétrica reduzida (diminuição do campo elétrico na região) localizada somente na região de detecção. Com o volume expandido da bolha a zona ao entrar nessa região tem sua velocidade reduzida e a zona se concentra. À medida que a zona da amostra se expande radialmente para preencher o aumento do volume, ela se contrai longitudinalmente, por fim a concentração da amostra permanece constante, mas o comprimento do caminho aumenta. Este tipo de capilar pode gerar um aumento de 3 vezes no sinal em relação ao capilar normal, além de um menor LOD e maior faixa linear de detecção.
- Célula tipo “Z”: Na Figura 10C é ilustrado outro tipo de célula que amplia o comprimento do caminho óptico. Neste design, o capilar é dobrado em forma de Z e a parte transversal é utilizada como célula óptica. A desvantagem deste tipo de capilar é

a perda da radiação que escapa ou fica presa na sílica fundida enquanto a parte restante é transmitida através da solução.

- Célula tipo “Z” com alta sensibilidade: As desvantagens acopladas à célula de fluxo tipo “Z” são removidas em um design celular ilustrado na Figura 10B. Esta configuração incorpora um corpo de sílica fundida com janelas flanqueadoras planas e uma célula de sílica fundida preta que reduz a luz dispersa. Seu caminho óptico tem um comprimento de 1,2 mm (chegando a 8 vezes maior que uma célula de bolha), portanto, mais sensível [121].

Figura 10. Desenhos de células de fluxo em seu eixo longitudinal. A = célula de bolha; B = célula de alta sensibilidade; C = célula Z. FONTE: [121]



A detecção por UV-Vis possui outras limitações como a de não detectar espécies não cromóforas, sendo necessário a derivatização, especialmente quando se trata de íons metálicos, os quais são muito comuns como co-íons em medicamentos e que não absorvem na região do espectro UV-Vis. Neste caso, o uso de detecção UV-Vis indireta apresenta limitações em função do pH (precipitação de íons metálicos em pHs elevados) necessário para a manutenção da estabilidade do cromóforo adicionado ao BGE [124].

1.7.2 Detecção por fluorescência

Quando uma substância é exposta a radiações UV, raios X ou catódicos, a mesma pode absorver essa radiação e, posteriormente, emitir em forma de luz. Porém, nem toda energia absorvida é emitida, pois pode ser transformada em energia cinética provocando colisões entre as moléculas excitadas e as moléculas do solvente, esse fenômeno é conhecido como relaxação não radiativa. O sistema de detecção por fluorescência é favorecido para moléculas rígidas, pois essa rigidez diminui a velocidade de relaxação não radiativa ao ponto que a relaxação por fluorescência tenha tempo de ocorrer [121].

Compostos que não apresentam luminescência intrínseca podem ser levados a fluorescer ou fosforescer a partir de diversas reações que alteram a estrutura da molécula e, conseqüentemente, as propriedades físico-químicas destes compostos, obtendo assim um derivado luminescente (derivatização), esta técnica é amplamente utilizada em métodos analíticos baseados na fluorescência. [125–128]. A detecção sem derivatização também é possível, pois a detecção indireta pode ocorrer a partir da inclusão de uma substância fluorescente ao BGE, todavia, a sensibilidade será menor.

O detector fluorimétrico é mais sensível que um detector espectrofotométrico, isso é possível pois as fontes para fluorescência são mais potentes (10 a 1000 vezes), e a detecção da emissão de uma pequena quantidade de luz é mais fácil do que a detecção da absorção. A fluorescência induzida por laser é um tipo de detecção utilizado em CE, no qual um laser é empregado como fonte de excitação. A desvantagem da pequena escala de volume em CE (menor caminho óptico) pode ser neutralizada por um aumento na intensidade da luz de excitação na janela de detecção e/ou a partir da aplicação de células com um volume expandido (bolha e célula de alta sensibilidade) [121,129].

1.7.3 Detecção Amperométrica (AD)

O sistema de detecção amperométrica (AD, do inglês “*amperometric detection*”) consiste na aplicação de um potencial constante em um microeletrodo de trabalho, sendo que a configuração pode ser composta por três ou dois eletrodos. O local de posicionamento deste detector no sistema CE é de grande importância, pois o potencial aplicado para gerar o campo elétrico usado na separação em CE pode interferir na corrente detectada no eletrodo de trabalho [130].

A AD é bem sensível, sendo que trabalhos que buscam melhorar este requisito são facilmente encontrados na literatura, como o de Chen e colaboradores [131]. Neste trabalho, os autores demonstram que é possível diminuir o LOD de analitos que possuam reações reversíveis, através de ciclos de oxidação e redução, ou seja, para a mesma molécula de analito, a corrente é medida várias vezes, aumentando o sinal analítico [100].

Umas das principais áreas de aplicação da AD é a determinação de compostos biológicos [132], fármacos [133] e de interesse ambiental [134]. AD pode ser útil em separações eletroforéticas em meio não aquoso, pois a maioria dos solventes utilizados absorve fortemente na região do UV, o que perturba as medidas fotométricas.

1.7.4 Detecção por espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas (MS, do inglês “*mass spectrometry*”) é um tipo de detecção comumente utilizada na elucidação de compostos desconhecidos e quantificação de compostos conhecidos. Quando acoplada a CE, uma junção das vantagens de ambas as técnicas podem ser aproveitadas, como resolução e eficiência da CE e a universalidade e sensibilidade do MS. No sistema CE-MS/ MS, os analitos com pequenas variações no tempo de migração ou até mesmo

que migram com mesma velocidade, podem ser diferenciados e adequadamente quantificados, assim, a inclusão deste detector à CE vem ganhando cada vez mais espaço na química analítica [89].

Basicamente o espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, onde as amostras são convertidas em íons e transferidos para a fase gasosa, um analisador de massas (relação carga/massa) destes íons e um detector [135].

A interface entre CE e MS comumente utilizada é o eletrospray (ESI, do inglês "*electrospray ionization*"), este tipo de interface elimina as moléculas não ionizáveis. O ESI envolve a produção de íons através da formação de um spray de solução contendo o analito em um campo elétrico, o qual é responsável em manter as moléculas no caminho sem ocorrer perdas. O eletrospray cria gotículas carregadas através de um processo de nebulização, à medida que as gotículas entram na fonte de íons, o solvente é removido diminuindo gradativamente o tamanho da gotícula até que sobrem os íons livres do solvente [135].

1.7.5 Detecção Condutométrica (CD)

Detectores condutométricos para CE foram inspirados nos dispositivos utilizados em cromatografia e isotacoforese. Mikkers e colaboradores usaram as flutuações do gradiente de potencial no interior da coluna, que é um modo de detecção condutométrica [136]. Em 1985 foi demonstrada a utilidade desse detector à sistemas CZE [137], onde as zonas eram exibidas com o auxílio de detectores condutométricos.

No método condutométrico convencional (com contato), a adaptação do detector no capilar geralmente é complexa, sendo necessário, geralmente, a realização de perfurações do capilar com laser de CO₂ para posicionar os dois eletrodos que compõem o detector. Os

eletrodos da célula condutométrica formam um capacitor e a solução atua como uma resistência onde o valor é dependente de sua condutividade elétrica [97].

1.7.5.1 Detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D)

A detecção condutométrica sem contato (CDD), ou detecção oscilométrica, têm se mostrado uma alternativa vantajosa à detecção condutométrica convencional (com contato). Em um CDD como a reatância capacitiva diminui com o aumento da frequência, a impedância do capilar é reduzida, permitindo que as oscilações de condutividade da solução interna do capilar sejam monitoradas mesmo que os eletrodos estejam instalados do lado externo do capilar [100].

A detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D do inglês, *capacitively coupled contactless conductivity detection*), foi utilizada para técnicas de eletromigração no início dos anos 80 para a determinação isotacoforética de íons [138].

Em 1998, dois trabalhos independentes, um publicado por Zemann [139] e colaboradores e outro por Fracassi da Silva e do Lago [140] propuseram a utilização do C⁴D como detecção para CE. Desde então esse detector se tornou alvo de inovação e exploração.

O sistema de detecção, de 1998, possui uma configuração com dois eletrodos tubulares, que circundam o capilar de separação, são posicionados paralelamente ao longo do eixo do capilar, sendo que o espaço entre os eletrodos (1 a 2 mm de comprimento) define o volume de detecção. O sinal senoidal é aplicado a um dos eletrodos, o outro eletrodo está conectado à entrada de um conversor corrente-tensão, portanto, a corrente que é detectada entre os dois eletrodos é proporcional à condutividade da solução que flui no interior do capilar, ao passar pelo segundo eletrodo esta corrente é convertida em tensão. A tensão é retificada, ou seja, a tensão é transformada em corrente contínua mantendo apenas um semiciclo da onda senoidal

do sinal. Ao final, o sinal é amplificado, compensando a linha base. A melhor frequência de operação pode ser otimizada, dependendo da dimensão do capilar e dos eletrodos, bem como a qualidade das peças eletrônicas utilizadas. Este detector utiliza um conversor digital-analógico (CAD) de 12 bits de resolução.

Em 2009, Francisco e do Lago [141] propuseram um modelo C⁴D mais compacto e de alta resolução em comparação ao anterior. Este modelo foi utilizado nos procedimentos descritos neste trabalho.

Nesta versão, a frequência e a amplitude foram otimizadas e fixadas para uma melhor performance, por uma questão de simplicidade, robustez e compacidade. Os valores de frequência e amplitude foram fixados com base no uso de eletrodos de 2 mm, espaçados por 0,51 mm e capilares com diâmetro interno de 20 μ m para 100 μ m preenchido com eletrólitos típicos usados em CE. Para compensar a falta de flexibilidade na mudança das condições operacionais que permitem otimizar o sinal, o foco deste detector é a redução do ruído, já que a característica mais desejada em um sensor não é a intensidade do sinal, mas a relação sinal-ruído. Nas versões anteriores, um retificador de meia onda foi usado, neste circuito, um retificador de onda completa foi implementado, dobrando o sinal na entrada do conversor. O conversor digital-analógico neste detector é de 22 bits de resolução, maior que a resolução de 12 ou 16 bits comumente utilizada em outras implementações. A vantagem do conversor digital-analógico é a eliminação do sistema de compensação de linha base, uma das características mais importantes deste detector. Para assimilar essa vantagem deve ter em mente que o sinal analítico é apenas uma pequena variação de corrente em uma alta corrente de linha base, essa condutividade é gerada pela base da solução, pelo sinal transmitido da sílica, poliimida, ar e deslocamento de tensão dos amplificadores operacionais, assim a estratégia para minimizar esse efeito é usar um sistema de compensação eletrônica. No presente circuito não há a adição de um sistema de compensação de linha base por hardware, pois o conversor digital-

analogico de 21 bits detecta variações de 1 parte em 2.097.152. Assim, a abordagem adotada converte o sinal bruto em um valor digital que pode ser interpretado e realizada a subtração da linha base por software [141].

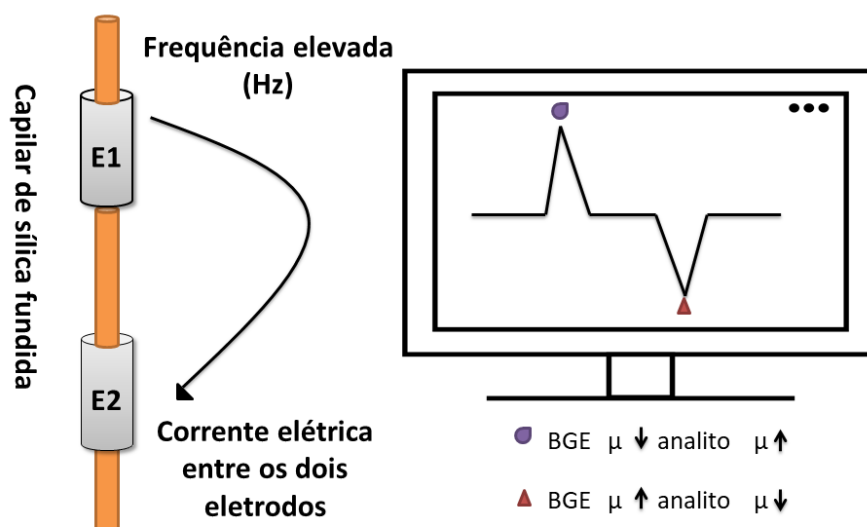
A detecção por C^4D possui vantagens como a possibilidade de detecção rápida e simultânea de íons metálicos com LOD na ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$. O seu custo é reduzido em relação à construção e manutenção, e por não entrar em contato com a solução previne a contaminação e o desgaste dos eletrodos, além de omitir a interferência do campo elétrico aplicado nas separações por CE, tendo uma melhor resposta analítica e robustez.

C^4D é uma opção de grande potencial para analitos que não absorvem no UV-Vis, por se tratar de um detector universal, com o benefício adicional de não requerer a abertura de janelas no capilar, elevando a sua durabilidade e facilitando o seu manuseio [98,100].

Como a corrente medida é uma propriedade da solução, nenhuma seletividade é encontrada neste tipo de detecção, sendo, de certa forma, uma vantagem quando aplicada às técnicas de separação (detector universal). O mecanismo de detecção C^4D ocorre a partir da substituição do co-íon presente no BGE pelo íon a ser analisado. Por exemplo, quando a mobilidade (μ) do analito for maior que a do co-íon do BGE haverá um aumento da condutividade na região do capilar e o detector é sensibilizado, obtendo o registro de um pico positivo no eletroferograma. Já quando o co-íon do BGE apresentar maior mobilidade que o íon do analito, o resultado será um pico negativo no eletroferograma, este esquema pode ser observado na Figura 11. Quanto maior for a diferença de mobilidade do BGE em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector, por isso o BGE possui papel fundamental na sensibilidade das espécies de interesse. O grande pico que é observado nos eletroferogramas, (na Figura 22, por exemplo) com detecção por C^4D , se refere à detecção da água juntamente com outras espécies neutras que co-migraram. A água, em geral, tem uma menor mobilidade

do que a mobilidade de qualquer BGE utilizado, justificando o sinal do pico ser geralmente negativo [119].

Figura 11. Esquema do sistema de detecção C⁴D com a representação de um eletroferograma de analitos com mobilidades diferentes. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção. FONTE: próprio autor.



A quantidade de estudos e aplicações realizadas utilizando o C⁴D acoplado a plataformas de eletroforese microfluídica está aumentando, caracterizadas pelo progresso em termos de melhoria nas células de detecção, geometria celular, alinhamento de eletrodos e estratégias de separação envolvendo este detector. Dispositivos com eletrodos tubulares é comumente utilizado para capilares convencionais, porém não adequada para aplicações em eletroforese com microchips (MCE), portanto são empregados eletrodos planos, os quais possuem um processo de fabricação mais fácil e compatível. A desvantagem de eletrodos planos é a capacitância de acoplamento, a qual é inferior à dos capilares convencionais. Do mesmo modo, a blindagem eficaz entre os eletrodos também é difícil e por estas razões, a presença de

um sinal de fundo significativo está normalmente presente no microchip, o que influencia de forma adversa no sinal-ruído do composto [130].

1.8 Análises rápidas por CE

Estudos dentro da química analítica, voltados para a determinação de compostos, tinham como prioridade o desenvolvimento de métodos que priorizam a seletividade e a sensibilidade, às vezes afetando o tempo de análise, prejudicando a frequência analítica. Atualmente esse padrão vem sendo abandonado, pois a demanda mudou, tornando necessário o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para serem ambientalmente amigáveis (menor gasto de energia) e para suprir a conveniência de reproduzir várias análises de rotina em um curto período de tempo.

Neste cenário, a técnica de separação CE, que é caracterizada por análises rápidas, pode tornar-se mais rápida através de diferentes estratégias: uso de instrumentos com vários capilares, onde é possível realizar separações de várias amostras simultaneamente [142], ou o uso de capilares com comprimento reduzido, sendo uma opção barata e de fácil manipulação [143]. A redução do comprimento do capilar, ou o aumento do potencial aplicado, proporcionam reduções significativas nos tempos de migração das espécies (t_m), como é demonstrado na Equação 12, onde (l) é o comprimento efetivo do capilar, (L) é o comprimento total do capilar e (E) é o potencial aplicado.

Equação 12

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

A CE acoplada a detectores C^4D vem sendo utilizada para a criação de métodos com alta frequência analítica. Na análise de fármacos são encontrados trabalhos como determinação de diclofenaco e seus contra-íons mais comuns [144], de escapolamina, orfenadrina, cafeína, dipirona e ácido ascórbico [78], de difenidramina, piridoxina e 8-cloroteofilina [145] e de

codeína e diclofenaco [146] ambos os trabalhos em menos de 1 min. Além da determinação de fármacos é possível encontrar diversos trabalhos utilizando CE- C^4D na análise de outros tipos de analitos em matrizes diferentes com o foco em análises rápidas, como determinação de metais em biodiesel [147], dois grupos de drogas, sendo 8 em uma corrida e 5 em outra [143] ambas em 1 min, 9 ácidos graxos em 16 min [148] e 22 compostos orgânicos e inorgânicos em menos de 3 minutos [149] .

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de métodos para análise ultra-rápida (menos de 1 min) e simultânea de princípios ativos presentes em medicamentos empregando a técnica de CE-C⁴D. Dois medicamentos com as composições listadas abaixo serão focos do trabalho:

- Amônio e difenidramina,
- Arginina, ácido ascórbico e aspartato.

2.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de dois métodos exatos e precisos, os quais serão otimizados e validados, obtendo assim um método para determinação de amônio e difenidramina, outro para arginina, ácido ascórbico e aspartato, ambos rápidos (menos de 1 min), com custo reduzido, sem necessidade de preparo de amostras e empregando a técnica CE-C⁴D.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Amostras

Todos os reagentes utilizados nos estudos são de grau analítico. Os reagentes 3- [[2-Hidroxi-1,1bis(hidroximetil)etil]amino]-1-propanossulfônico (TAPS), cloridrato de difenidramina e trietilamina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Ácido 2-(morfolin-4-il)etano-1-sulfônico (MES), ácido ascórbico e metanol foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Brasil), cloreto de amônio foi obtido pela empresa Cinética Química (São Paulo, Brasil). O hidróxido de lítio foi adquirido da Riedel-deHaën (Seelze, Alemanha) e hidróxido de sódio pela Dinamica (Diadema, Brasil). Arginina foi adquirido na ExataVet (Uberlândia, Brasil), ácido aspártico da empresa Synth (Diadema, Brasil). A água deionizada (18 MQ cm⁻¹) foi obtida em um sistema de purificação Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). Acetonitrila e ácido fosfórico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e utilizados como fase móvel nas análises cromatográficas. Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza (P. A.) superiores a 98%, com exceção do ácido fosfórico (85 %).

As amostras farmacêuticas comerciais contendo NH₄⁺ + DIP e ARG + ASC + ASP foram adquiridas em drogarias locais. No procedimento de preparo das amostras, oito comprimidos de cada amostra foram pesados e em seguida macerados a um pó fino e homogêneo, todas amostras trabalhadas apresentaram alta solubilidade em água. As soluções estoque de padrões e amostras foram preparadas diariamente antes das análises, através da dissolução em água deionizada, agitação e sonicação durante 10 minutos em um banho ultrassom e por fim filtradas por um filtro de membrana (tamanho de poro de 0,45 µm) antes da análise no sistema CE-C⁴D.

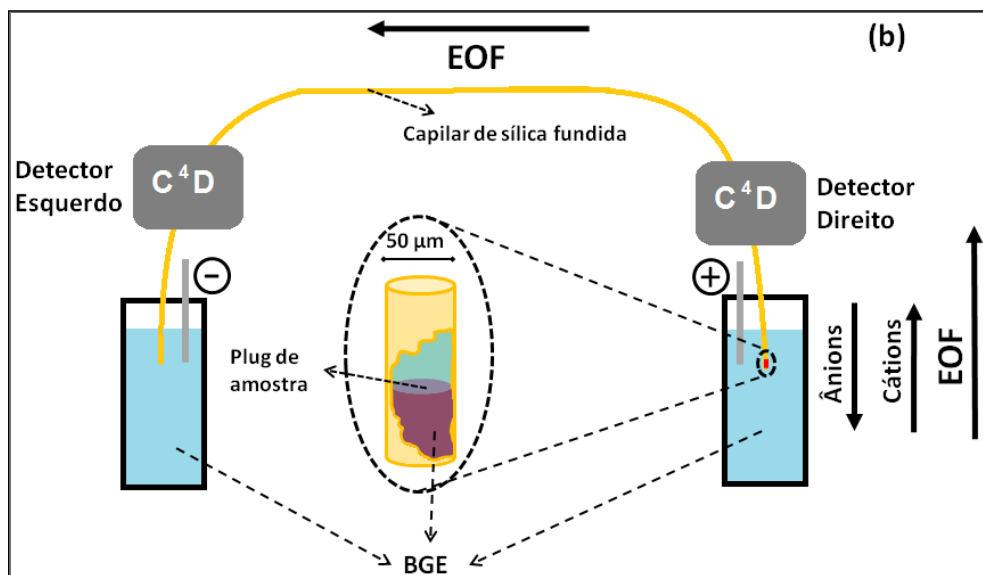
3.2. Instrumentação para determinação de fármacos por CE-C⁴D

Todas as análises foram realizadas através de um equipamento de eletroforese capilar com detecção C⁴D construído no laboratório do Prof. Claudimir Lúcio do Lago do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) [140,141]. O equipamento é composto por dois detectores condutométricos sem contato de alta resolução acoplados capacitivamente, dois reservatórios, com capacidade pra 1 mL, fonte de alta tensão bipolar com capacidade máxima de 30 kV e um sistema de controle de temperatura. Imagens do equipamento usado nos trabalhos realizados e o esquema de funcionamento do sistema de CE são apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Figura 12. Imagem do equipamento de CE usado nos estudos.



Figura 13. Esquema do sistema CE e modo de injeção hidrodinâmica (pressão positiva) usado nesse trabalho. FONTE: [120]



A versão utilizada, em todos os experimentos, do C^4D , não possui partes móveis, como potenciômetros e conectores, sendo assim, o detector é compacto e robusto. Um oscilador, trabalhando na frequência de 1,1 MHz, foi otimizado para uso de capilares com diâmetro interno no intervalo de 20 até 100 μm . O sinal do oscilador é do tipo senoidal e sua amplitude é de 4 Vpp [141].

A introdução das soluções padrão ou amostra foram realizadas a partir da aplicação da pressão positiva fixa (25 kPa) na extremidade direita do equipamento (detector 1). Sucessivamente, a partir da aplicação de uma diferença de potencial, as espécies em análise migram em direção ao detector (processo de separação). O equipamento possui dois detectores, um localizado a 10 cm de uma extremidade (detector 1) e outro a 10 cm da outra extremidade (detector 2). O capilar de sílica fundida utilizado em todos os trabalhos tinha 50 cm de comprimento, 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA,

EUA). Portanto as espécies percorrem 10 cm da coluna para chegar até o primeiro detector e 40 cm até o segundo detector. Sendo, comprimentos efetivos de coluna de 10 e 40 cm.

Antes da execução dos experimentos os capilares foram pré-condicionados diariamente por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ em um intervalo de 15 minutos, em seguida com água deionizada durante 10 minutos e, finalmente, com BGE aplicado nas análises durante 10 minutos. No final de cada experimento o capilar era lavado com água deionizada durante 10 minutos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a uma pressão constante de 25 kPa. O equipamento de CE contém uma fonte de alta tensão bipolar com capacidade máxima de 30 kV. No entanto, o potencial máximo aplicado com segurança era de 25 kV. Fugas de alta tensão foram observadas em potenciais maiores. Não foi necessário o condicionamento do capilar entre as corridas.

3.2.1 Otimização das condições de determinação de NH₄⁺ e DIP

Inicialmente, sete composições de BGE foram testadas a fim de incorporar diferentes valores de força iônica e distintas capacidades tamponantes, buscando o melhor desempenho, sendo eles:

- BGE-1: MES/HIS ;
- BGE-2: TRIS/TAPS;
- BGE-3: TEA/ ácido oxálico;
- BGE-4: CHES/ NaOH;
- BGE-5: ácido bórico/ NaOH;
- BGE-6: MES/NaOH ;
- BGE-7: MES/ LiOH ;

Foram realizados experimentos de otimização, como:

- Concentração do tampão ($10\text{-}50\text{ mmol L}^{-1}$);
- Tempo de injeção ($0,5 - 2,0\text{s}$);
- Potencial de separação ($15\text{-}25\text{kV}$);
- Temperatura ($20\text{-}30^{\circ}\text{C}$).

A solução do BGE considerada ideal foi preparada diariamente em um volume de 10mL, sendo utilizado normalmente apenas 3mL da solução estoque.

3.2.2 Otimização das condições de determinação de ARG, ASC e ASP

Assim como na determinação de NH_4^+ e DIP, o primeiro estudo realizado para a determinação simultânea de ARG, ASC e ASP foi a escolha do BGE, onde testou-se 6 composições de BGE com valores de força iônica e capacidades tamponantes distintas, buscando o melhor desempenho, sendo eles:

- BGE-1: MES/ HIS ;
- BGE-2: TRIS/ TAPS ($\text{pH}=8,3$);
- BGE-4: β – alanina/ NaOH;
- BGE-5: ácido bórico/ NaOH;
- BGE-6: TAPS/ NaOH;
- BGE-7: TAPS/ KOH;

Foram realizados experimentos de otimização, como:

- pH do BGE ($8,1\text{-}9,0$);
- Concentração do BGE ($10\text{-}30\text{ mmol L}^{-1}$);
- Tempo de injeção ($0,5 - 2,0\text{s}$);
- Potencial de separação ($15\text{-}25\text{kV}$);
- Temperatura ($20\text{-}30^{\circ}\text{C}$).

A solução do BGE considerado ideal foi preparada diariamente em um volume de 10mL, sendo utilizado normalmente apenas 3mL da solução estoque.

Excipientes normalmente encontrados nas amostras comerciais (sacarina, carbonato e ácido tartárico) foram testados com a finalidade de verificação destes serem potenciais interferentes, para garantir que independente da matriz encontrada o método será eficiente na determinação de ARG, ASC e ASP.

3.2.3 Metodologias de determinação de DIP e ARG por HPLC

Os procedimentos de comparação para a determinação das espécies foram baseados em cromatografia líquida. As medições foram realizadas com um cromatógrafo Shimadzu LC-10 VP equipado com um detector UV-vis (SPD-10AV), uma coluna LC (Phenomenex 110A, Gemini-C18, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), um injetor manual (20 μ L) e uma bomba (LC-10AD-VP).

Para DIP a fase móvel foi composta por metanol e 0,01 mol L⁻¹ de H₃PO₄ (45:55, v/v, respectivamente), com valor de pH ajustado para pH 7,0 com trietilamina e uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. A detecção foi realizada a 210 nm. Estas condições foram utilizadas na análise de três amostras de marcas distintas e foram adaptadas de [42].

Para ARG o experimento realizado foi adaptado de [64], no qual a fase móvel foi composta por acetonitrila e 0,02 mol L⁻¹ de H₃PO₄ (59:41, v/v, respectivamente), com valor de pH ajustado para pH 3,0 com KOH e uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. A detecção foi realizada a 210 nm. Estas condições foram utilizadas na determinação do teor de ARG em três amostras de marcas distintas.

3.3 Metodologias de determinação de NH_4^+ , ASC e ASP por titulação

A determinação de NH_4^+ foi baseada no método de Kjeldahl para determinação de nitrogênio total. Um sistema de destilação foi montado, no qual a amostra foi adicionada em um balão de fundo redondo. Uma solução de 60 mL de NaOH a 50% (m/v) foi adicionada ao balão, com o sistema vedado, a mistura de NaOH e amostra foi levada à fervura e destilação a uma velocidade de aquecimento constante, até que o volume remanescente seja igual à metade ou um terço do volume original. Neste processo o NH_4^+ é convertido a NH_3 devido a adição do NaOH, a amônia produzida reage com o HCl (em excesso) no frasco coletor. O excesso de HCl é titulado com NaOH, utilizando como indicador a fenoftaleína, e o amônio é quantificado de forma indireta. Estas condições foram adaptadas do método Kjeldahl, encontrado na farmacopeia brasileira [38].

A Iodometria foi o método de comparação utilizado na determinação do teor de ASC nas três amostras, o procedimento foi realizado fielmente de acordo com a farmacopeia brasileira [53].

Para comparação, o teor de ASP nas três amostras foi determinado a partir da titulação ácido-base, onde o analito foi titulado com NaOH, o procedimento foi realizado da forma descrita em [74].

Em todas as titulações realizadas foram adicionadas nas amostras concentrações de padrões dos outros compostos presentes na amostra. Este ensaio tem a finalidade de garantir que os resultados obtidos não foram comprometidos devido a presença de outras espécies na amostra, já que os métodos de comparação determinam o teor do analito de interesse, mas não consideram o tipo de matriz o qual a espécie está inserida.

3.4 Validação dos parâmetros analíticos do método proposto

3.4.1 Limite de detecção e quantificação

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [150] o limite de detecção (LOD), expresso como concentração, ou quantidade, é derivado da menor medida detectável com razoável certeza para um determinado procedimento analítico. Em outras palavras, é a quantidade mínima, em concentração, de um analito que produza um sinal analítico de três vezes maior que o sinal da ausência total de analitos (branco). Ou seja, o valor de concentração mais baixa possível em que o analitos conseguem ser distinguidos do ruído do branco com confiança, e na qual a sua detecção é praticável.

O LOD, convencionalmente, é calculado por medidas em replicatas ($n=10$) de uma calibração utilizando como o sinal analítico do ruído ou de um branco de amostra. Portanto, o LOD pode ser avaliado com base em parâmetros matemáticos pela triplicata do quociente entre o desvio padrão do branco e pela inclinação da curva analítica, representados pela equação ($3SB/b$), na qual, SB é o desvio padrão das 10 medidas do branco, e o b é a inclinação (sensibilidade) da curva analítica. A desvantagem desse 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 [151].

Outra forma para determinar o valor de LOD é a partir de injeções de soluções contendo os analitos de interesse, utilizando concentrações cada vez mais baixas, em uma diluição progressiva, até que não haja distinção entre o pico do analito e o ruído de fundo [152,153], esta forma foi a utilizada para calcular os valores de LOD e LOQ. A vantagem dessa abordagem são os dados obtidos que podem ser comparados a resultados provenientes das

baixas concentrações dos padrões, e determinar, quais valores de concentração de analito são necessários para se distinguir da linha base e concluir se o analito está presente ou não.

3.4.2 Precisão (repetibilidade)

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

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

Sendo: s: desvio padrão absoluto

$\bar{x}$: média dos sinais analíticos

O teste intra dias foi feito a partir de 10 injeções sucessivas no mesmo dia, mesmo equipamento e o mesmo analista. O teste inter dias foi feito a partir de 3 injeções em dias distintos com o mesmo equipamento e o mesmo analista.

3.4.3 Exatidão (ensaios de recuperação)

A fim de avaliar a exatidão dos métodos propostos, testes de adição e recuperação usando amostras farmacêuticas também foram realizados. Neste estudo, as amostras foram diluídas adequadamente e analisadas sem e com a adição do padrão.

Os resultados obtidos nos estudos de adição e recuperação foram calculados a partir da seguinte equação:

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

Sendo: C_{final} : Concentração analisada na amostra após a adição do padrão do fármaco;

C_{amostra} : Concentração original dos princípios ativos na amostra;

$C_{\text{adicionada}}$: Concentração adicionada de fármacos (princípios ativos) na amostra.

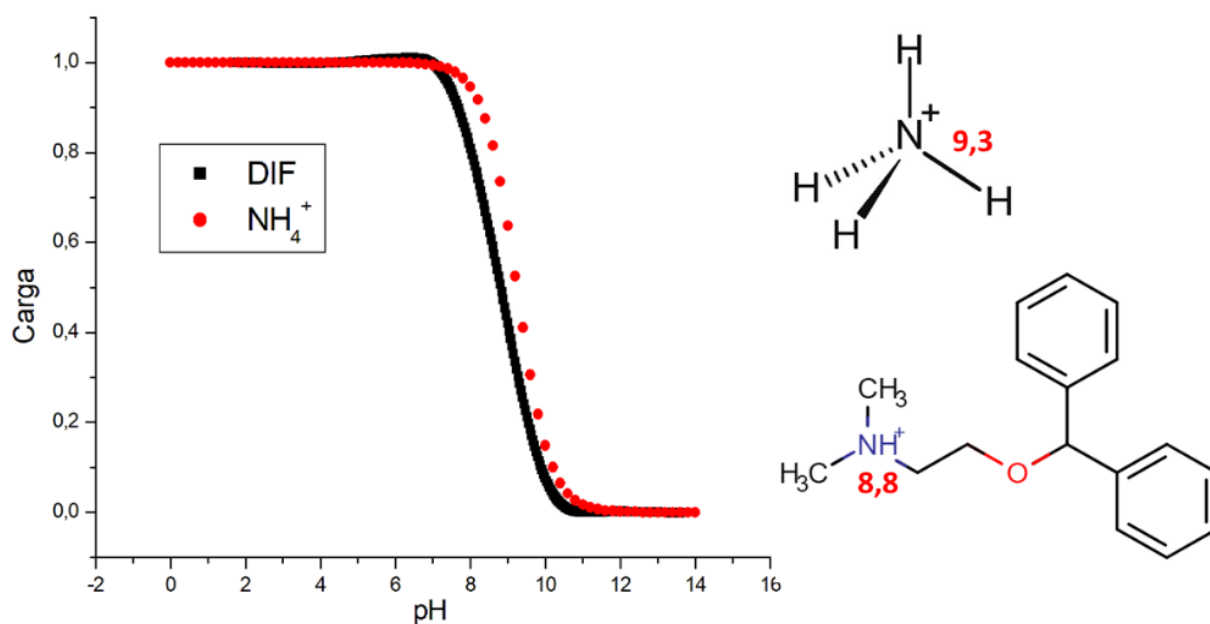
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação simultânea de DIP e NH_4^+

O BGE e sua composição possuem uma grande influência na sensibilidade e eficiência de separação. As mobilidades eletroforéticas de NH_4^+ e DIP no capilar serão dependentes do pH da solução, uma vez que ambas as moléculas possuem caráter básico fraco. Em soluções com pH abaixo de seus respectivos pKas, as espécies estarão carregadas positivamente e a separação e determinação será possível por CZE.

NH_4^+ e DIP têm valores de pKa semelhantes e são estimados em 9,3 [154] e 8,8 [5], respectivamente. Assim, a predominância da forma catiônica de ambas as espécies é observada em soluções com valores de pH inferiores a 9, como é ilustrado na Figura 13.

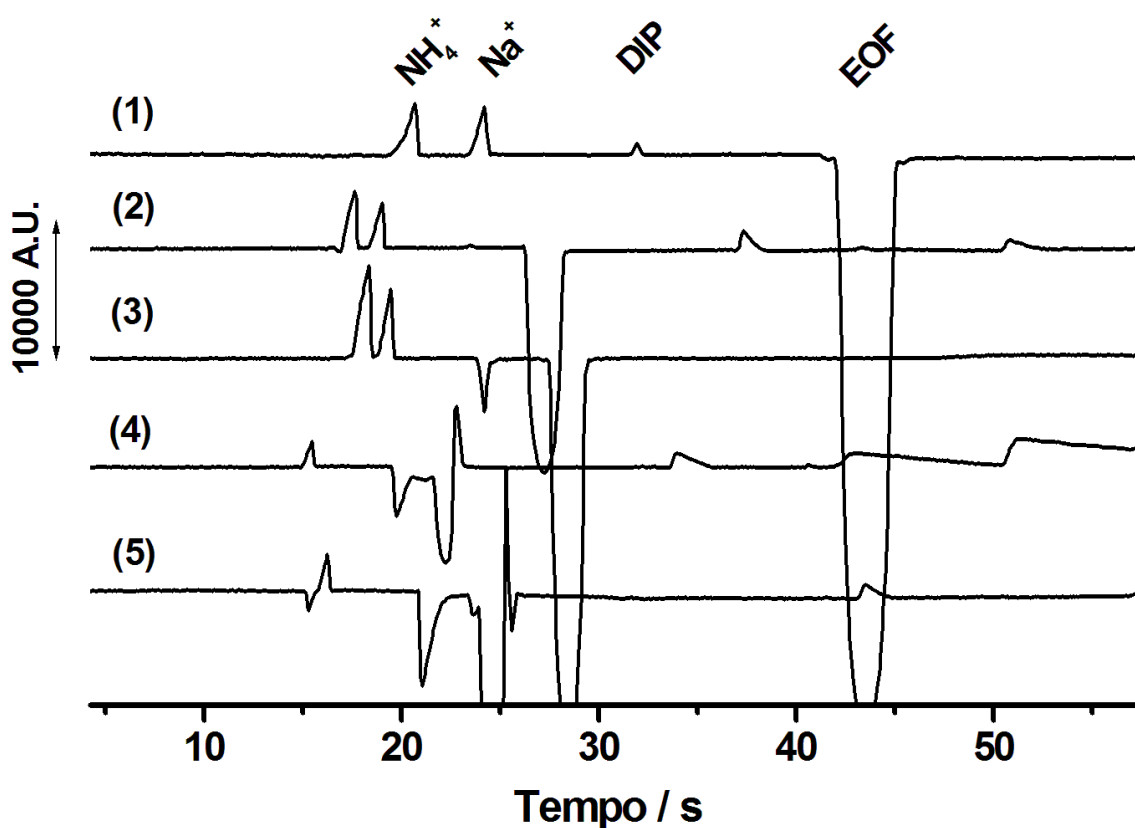
Figura 14. Estruturas moleculares com valores de pKa do NH_4^+ e DIP e suas respectivas curvas da relação de carga versus pH.



A estratégia traçada para a determinação simultânea dos dois compostos por CE-C⁴D se iniciou com a escolha da composição do BGE que: (i) garantisse a manutenção do pH em valor constante para que a mobilidade das espécies em análise se mantenham constantes; (ii) apresentasse mobilidade (condutividade) diferente das espécies em análise para que a detecção seja possível. Simulações empregando o software Peakmaster foram realizadas para estimar quais BGEs apresentariam potencial para separação e detecção dos compostos alvos deste estudo [155]. A avaliação do BGE visou uma ampla faixa linear de trabalho, já que nas amostras farmacêuticas, a DIP se apresenta em uma proporção 50 vezes menor que o NH₄⁺ (m/m).

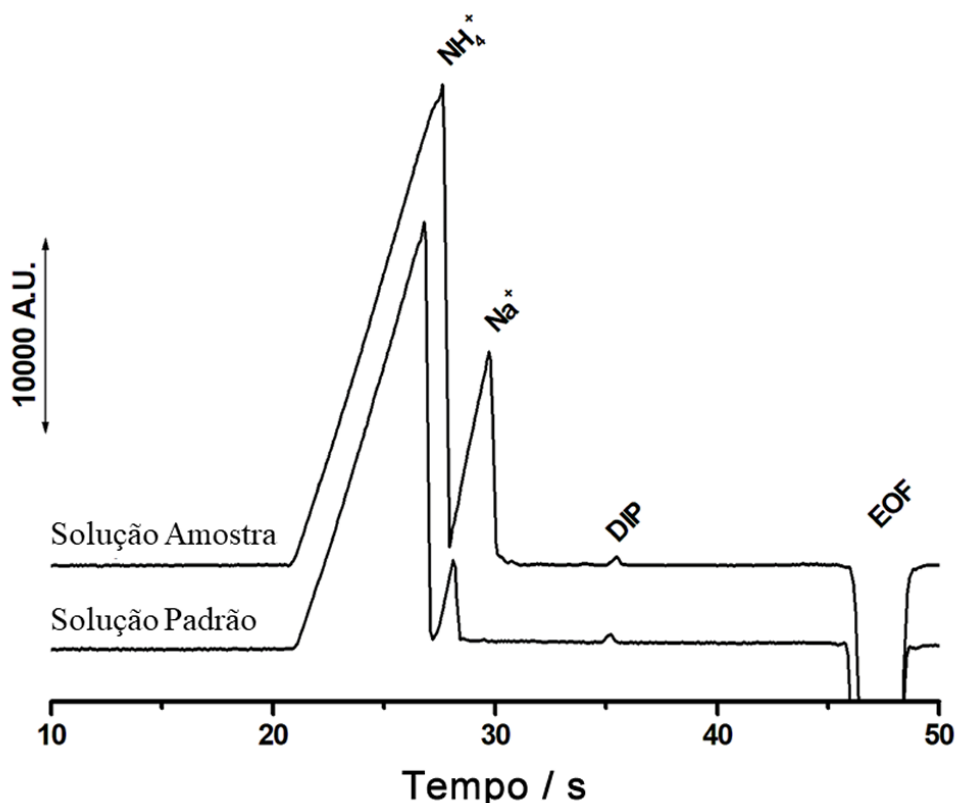
A Figura 15 ilustra a influência de diferentes BGE's na separação e detecção de NH₄⁺ e DIP. Na condição 15.5, o BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH ajustado em 8,5 com NaOH, apresentou a melhor sensibilidade para DIP, todavia, o pico do NH₄⁺ se mostrou muito próximo a um pico de sistema, o qual poderia interferir no desempenho do método. A condição 15.4 (BGE = 20 mmol L⁻¹ CHES + NaOH até pH=8,5) apresentou um pico deformado para DIP e sensibilidade menor para o NH₄⁺. Na condição 15.3 (BGE = 12 mmol L⁻¹ Trieta/ 1.8 mmol L⁻¹ ácido oxálico; pH=8,6), a resolução entre os picos de NH₄⁺ e Na⁺ é pequena ($r = 1,1$), o que poderia ser um problema na análises de amostras devido a presença de NH₄⁺ em altas concentrações. A condição 15.2 (BGE = 10 mmol L⁻¹ TRIS/ 10 mmol L⁻¹ TAPS) não apresentou pico para a DIP (mobilidade do BGE similar à da DIP). Finalmente, na condição 15.1 (BGE = 20 mmol L⁻¹ MES e 20 mmol L⁻¹ de HIS; pH = 6) apresentou boa detectabilidade para DIP (pico bem definido) e resolução maior entre NH₄⁺ e Na⁺ (excipiente inativo).

Figura 15. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo NH_4^+ , Na^+ e DIP ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ cada) nos seguintes BGE's: (1) 20 mmol L^{-1} MES/ 20 mmol L^{-1} HIS (pH=6,0); (2) 10 mmol L^{-1} TRIS/ 10 mmol L^{-1} TAPS (pH=8,4); (3) 12 mmol L^{-1} TEA/ $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ácido oxálico (pH=8,6); (4) 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH (pH=8,5); (5) 20 mmol L^{-1} ácido bórico + NaOH (pH=8,5). Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: $50 \text{ }\mu\text{m}$.



No estudo seguinte, o BGE que apresentou o melhor desempenho foi testado na análise de uma solução amostra e de uma solução padrão de composição similar a amostra. A Figura 16 mostra os eletroferogramas obtidos com a injeção de ambas as soluções (amostra e padrão).

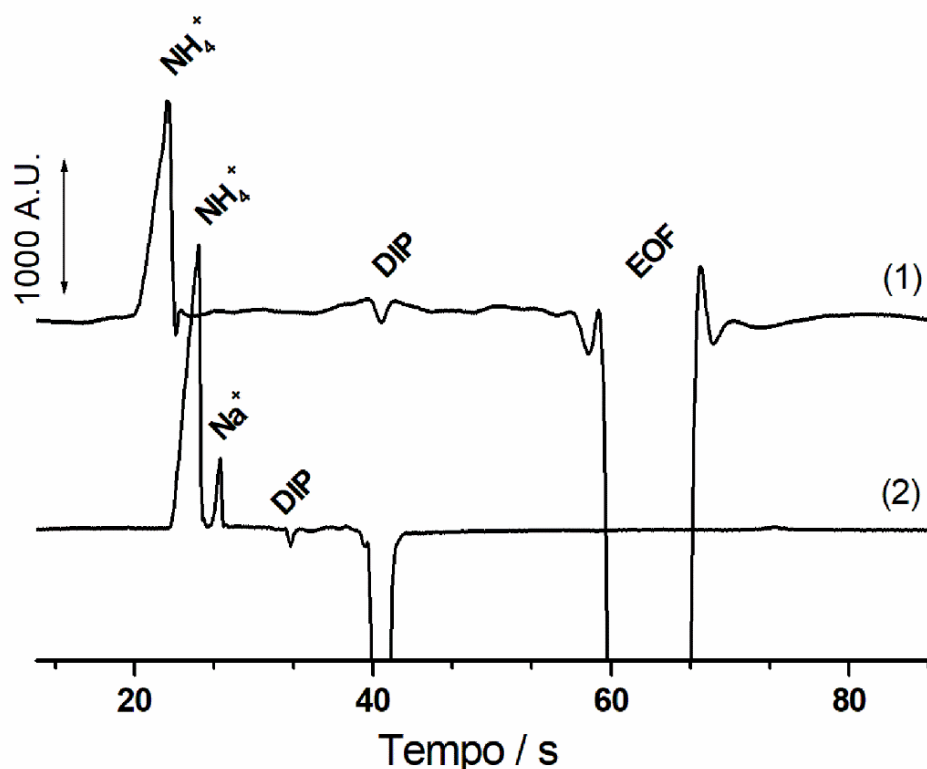
Figura 16. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão e amostra contendo NH_4^+ (20 mmol L^{-1}), DIP ($0,8 \text{ mmol L}^{-1}$) e Na^+ ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} MES/ 20 mmol L^{-1} HIS (pH=6,0). Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: 50 μm .



Como pode ser observado na Figura 16, a amostra contém uma grande quantidade de sódio, mais do que previsto, assim os picos do NH_4^+ e Na^+ não apresentaram resolução adequada, o que poderia dificultar a obtenção do valor correto da área do pico. Com a diluição da amostra e melhoria da resolução, o problema foi transferido para a DIP, a qual se apresentou com uma sensibilidade muito baixa, quase indetectável.

Neste ponto do trabalho, a estratégia foi direcionada na busca de um BGE com maior sensibilidade à DIP e com menor detectabilidade para o Na^+ , diminuindo assim sua interferência nas análises. Os seguintes BGE's foram testados para este fim: (i) MES com pH ajustado para 6,0 com NaOH e, (ii) MES com pH ajustado para 6,0 com LiOH.

Figura 17. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução amostra contendo NH_4^+ (10 mmol L^{-1}), Na^+ ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) e DIP ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$) nos seguintes BGE's: (1) $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MES/ } 15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaOH}$ ($\text{pH}=6,0$) e (2) $30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MES/ } 15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ LiOH}$ ($\text{pH}=6,0$). Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0 \text{ s}$, diâmetro interno do capilar: $50 \text{ }\mu\text{m}$.

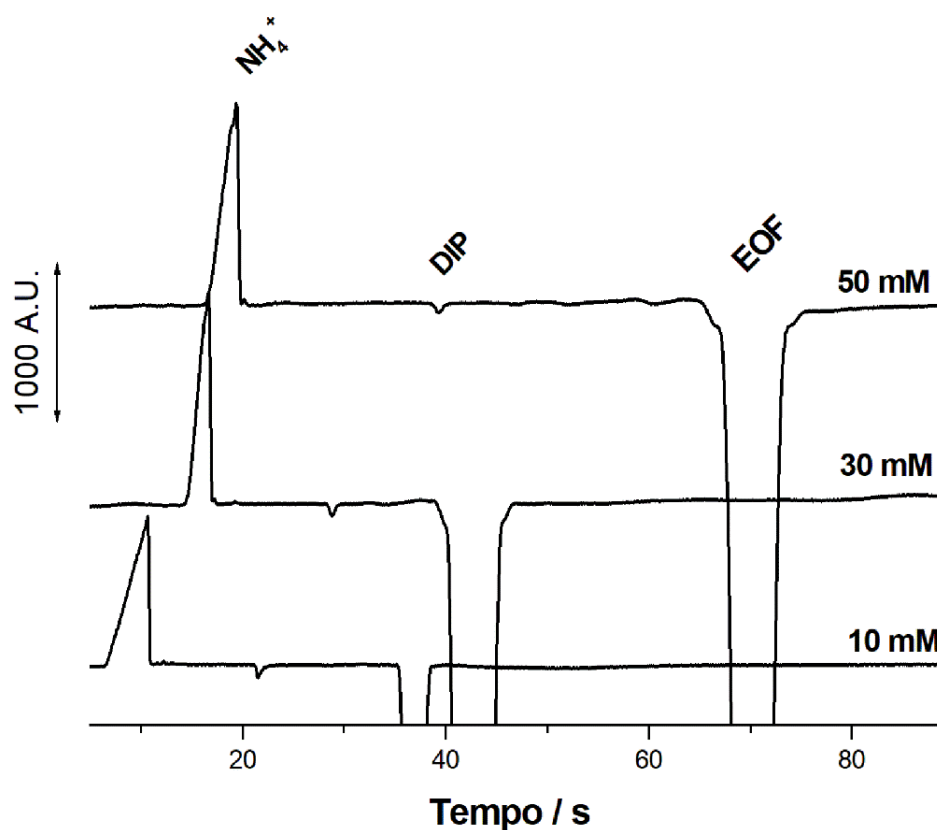


Ao analisar a Figura 17 pode-se observar que o pico do sódio foi minimizado ou eliminado nessas condições, melhorando a seletividade do método. Conforme esperado, na condição 17.1, a adição do Na^+ ao BGE aumentou a mobilidade do mesmo a um valor semelhante à mobilidade do Na^+ presente na amostra. No entanto, este aumento na mobilidade do BGE deixou o eletroferograma com maior instabilidade na linha base (efeito Joule). Além disto, o tempo de análise também foi maior. No BGE com pH ajustado com LiOH (condição 17.2), um comportamento similar foi observado, pois a mobilidade do íon Li^+ ($\mu_{\text{ef}} = 35$) é maior que da HIS ($\mu_{\text{ef}} = 11,75$) em $\text{pH} = 6,0$. Neste BGE é possível observar picos simétricos e finos, com boa resolução, linha base estável, um ganho no tempo de análise e a seletividade para um

potencial interferente que é o sódio. A partir destes resultados, o BGE composto por MES e LiOH foi selecionado para prosseguir com os estudos.

Após a otimização da composição do BGE, o próximo estudo consistiu em avaliar sua concentração na qual as espécies de interesse apresentassem melhor comportamento em relação a sua detectabilidade neste BGE. A Figura 18 exibe eletroferogramas da solução contendo os analitos NH_4^+ e DIP em tampões de diferentes concentrações.

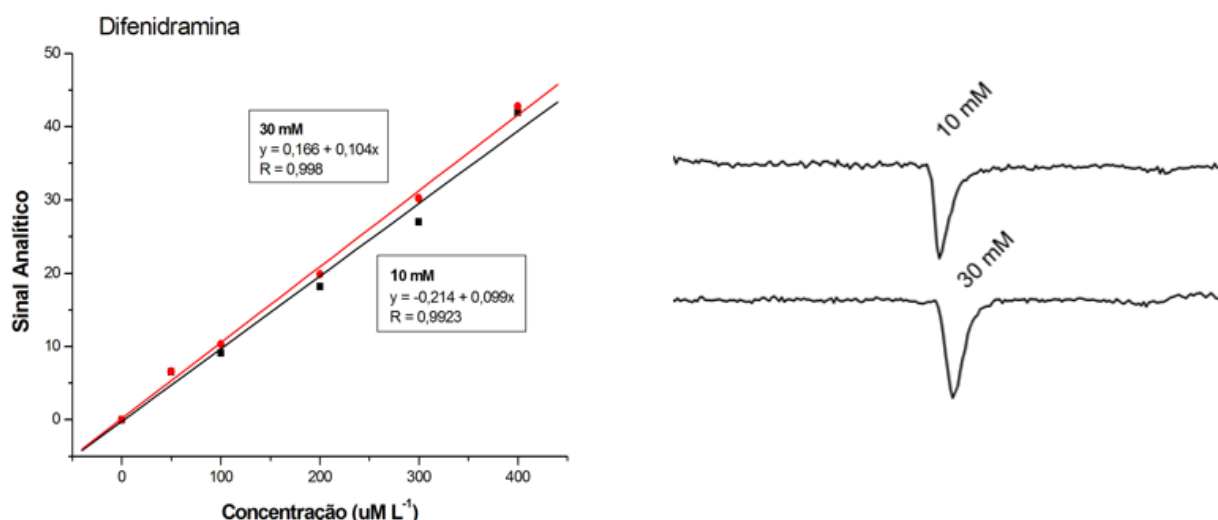
Figura 18. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo NH_4^+ (5 mmol L^{-1}) e DIP (0,1 mmol L^{-1}). BGE: MES (10; 30; 50 mmol L^{-1}) pH = 6,0, ajustado com LiOH. Demais condições: Vide figura 17.



Como pode ser observado na Figura 17, em termos de tempo de análise os eletroferogramas de 30 mM e 10 mM de MES se mostraram com melhores resultados, em relação à detectabilidade da DIP, ambos visualmente se mostraram semelhantes. O aspecto que

pode diferenciar os resultados obtidos é investigar qual concentração do BGE, de fato, apresentará uma melhor sensibilidade para a DIP, portanto, foram construídas duas curvas para analisarmos a sua inclinação.

Figura 19. Curvas analíticas e picos da DIP em BGE's de diferentes concentrações.



A Figura 19 mostra que não há diferença significativa na sensibilidade dos dois BGE's, portanto, a escolha da concentração do BGE foi definida a partir da capacidade tamponante de cada BGE, considerando que a amostra possui uma elevada concentração de NH_4^+ , o tampão escolhido para dar continuidade ao estudo foi o composto por 30 mmol L^{-1} MES e 15 mmol L^{-1} LiOH.

As espécies NH_4^+ e DIP, em $\text{pH} = 6,0$, estão completamente em sua forma catiônica, vale ressaltar que a utilização desse BGE confere uma maior robustez e reprodutibilidade ao método de determinação proposto, uma vez que a mobilidade eletroforética das espécies permanecerá constante, mesmo com pequenas alterações no pH do BGE.

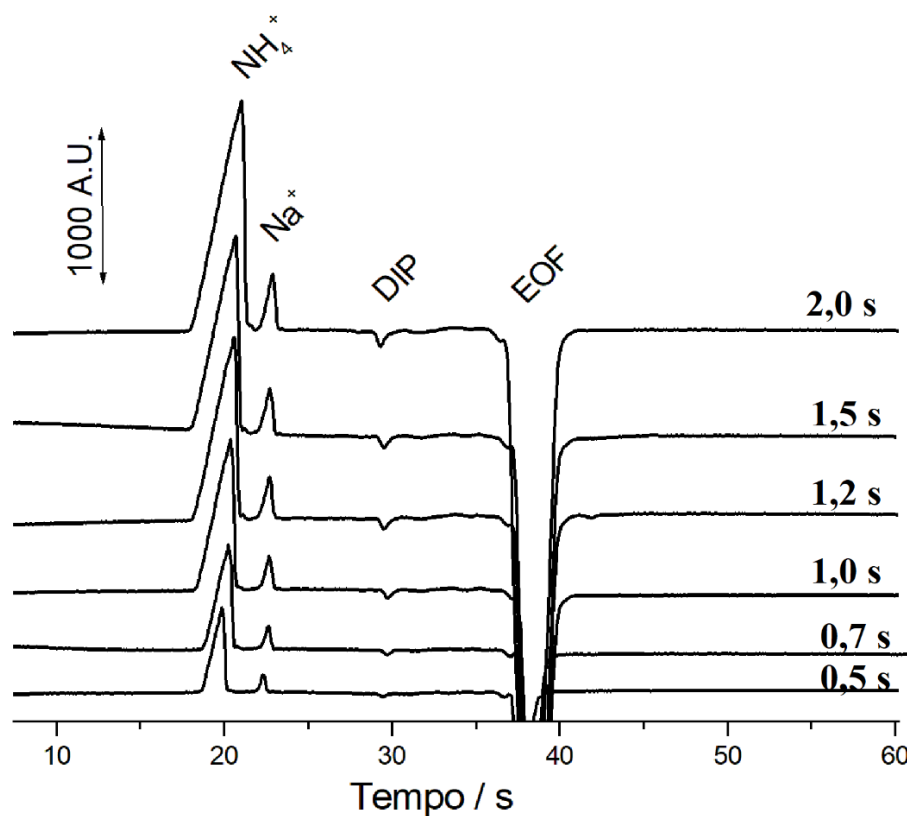
Para a obtenção de melhores condições instrumentais, parâmetros como tensão de separação, temperatura e tempo de injeção foram avaliados. O melhor desempenho (resolução, eficiência de separação, relação sinal-ruído e tempo de análise) foi obtido nas condições

experimentais disponibilizadas na Tabela 3. Quando se tem problemas com sensibilidade é comum tempos de injeção maiores, e consequentemente, maiores áreas dos picos, devido a maior quantidade de analito injetada no capilar. Elevados tempos de injeção são indesejados quando a resolução é afetada negativamente. Como observado na Figura 20, o tempo de injeção 1,2 s foi o que proporcionou maiores áreas dos picos sem perder, de forma significativa, em resolução.

Tabela 3. Condições otimizadas do método proposto CE-C⁴D.

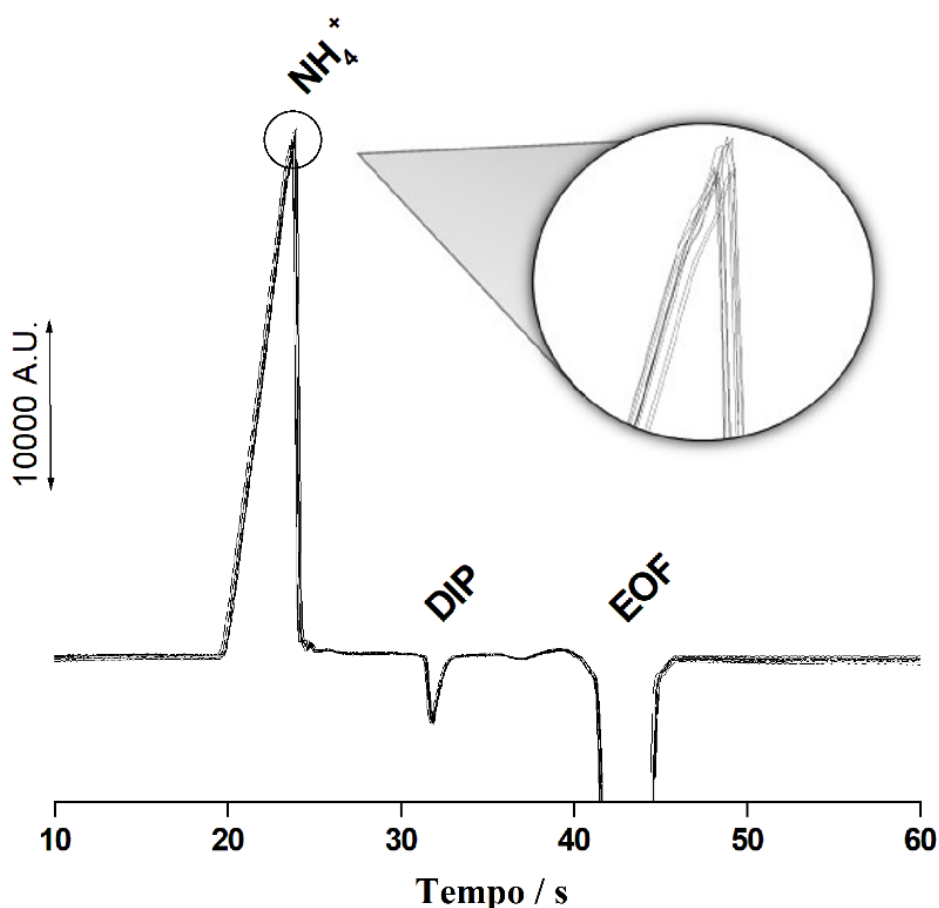
Parâmetros	Faixa avaliada	Valor otimizado
Concentração do BGE (mmol L⁻¹)	10-50	30
Potencial de separação (kV)	15-25	25
Tempo de injeção (s) (25 kPa)	0,5-2,0	1,2
Temperatura (°C)	20-30	25

Figura 20. Estudo do tempo de injeção utilizando uma solução amostra contendo NH_4^+ (10 mmol L^{-1}), DIP ($0,4 \text{ mmol L}^{-1}$) e Na^+ ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: 30 mmol L^{-1} de MES + 15 mmol L^{-1} de LiOH, pH = 6,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 – 2,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Após a escolha das melhores condições do tempo de injeção, procedeu-se com o estudo de repetibilidade do tempo de migração e área de pico para checar a estabilidade do sistema. O desempenho do sistema é mostrado na Figura 21 com 10 injeções sucessivas de uma solução padrão contendo NH_4^+ e DIP. As características analíticas do método calculadas a partir dos eletroferogramas estão apresentadas na Tabela 4.

Figura 21. Estudo da repetibilidade do tempo de migração dos íons utilizando uma solução padrão contendo NH_4^+ (15 mmol L^{-1}) e DIP ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$). BGE: 30 mmol L^{-1} de MES + 15 mmol L^{-1} de LiOH, $\text{pH} = 6,0$. Injeção hidrodinâmica: $25 \text{ kPa } 1,2\text{s}$; potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.



Após o tratamento estatístico dos dados, o método proposto apresentou boa estabilidade, com desvios padrões relativos (intra-dia) em relação à área e tempo de migração nos valores de 2,5% e 0,4 % ($n = 10$) para NH_4^+ e 2,1% e 0,1% ($n=10$) para DIP, respectivamente, os resultados obtidos mostram que não há necessidade de fazer o “flush” no capilar, ou seja, renovação do BGE dentro do capilar entre dez análises sucessivas. O estudo inter-dia em relação à área e tempo de migração também foram avaliados, obtendo desvios padrões relativos ($n = 3$) nos valores de 4,9% e 7,1 % para NH_4^+ e 2,6% e 1,4 % ($n = 3$) para DIP, respectivamente, isto significa que o método possui elevada estabilidade mesmo em dias

distintos, portanto, o analista pode optar por fazer ou não a calibração diária do método proposto, sendo que o mais adequado é a calibração diária quando houver a necessidade de resultados com maior precisão e exatidão.

Após os estudos de otimização e obtenção de resultados de repetibilidade das análises intra e inter dia, faixas lineares de resposta das espécies de interesse foram exploradas, como pode ser observada nas Figuras 22 e 23, onde mostram o estudo da linearidade elaborado de duas maneiras. Avaliou-se injeções de padrões em concentrações crescentes, a primeira com as espécies em proporções diferentes, assim como elas são encontradas em amostras farmacêuticas e a segunda com as espécies em quantidades iguais. A faixa linear é apresentada nas Figuras 22 e 23.

Figura 22. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões em concentrações crescentes de NH_4^+ (2,5-20 mmol L^{-1}) e DIP (0,05-0,7 mmol L^{-1}) e suas respectivas curvas analíticas. Demais condições vide Figura 20.

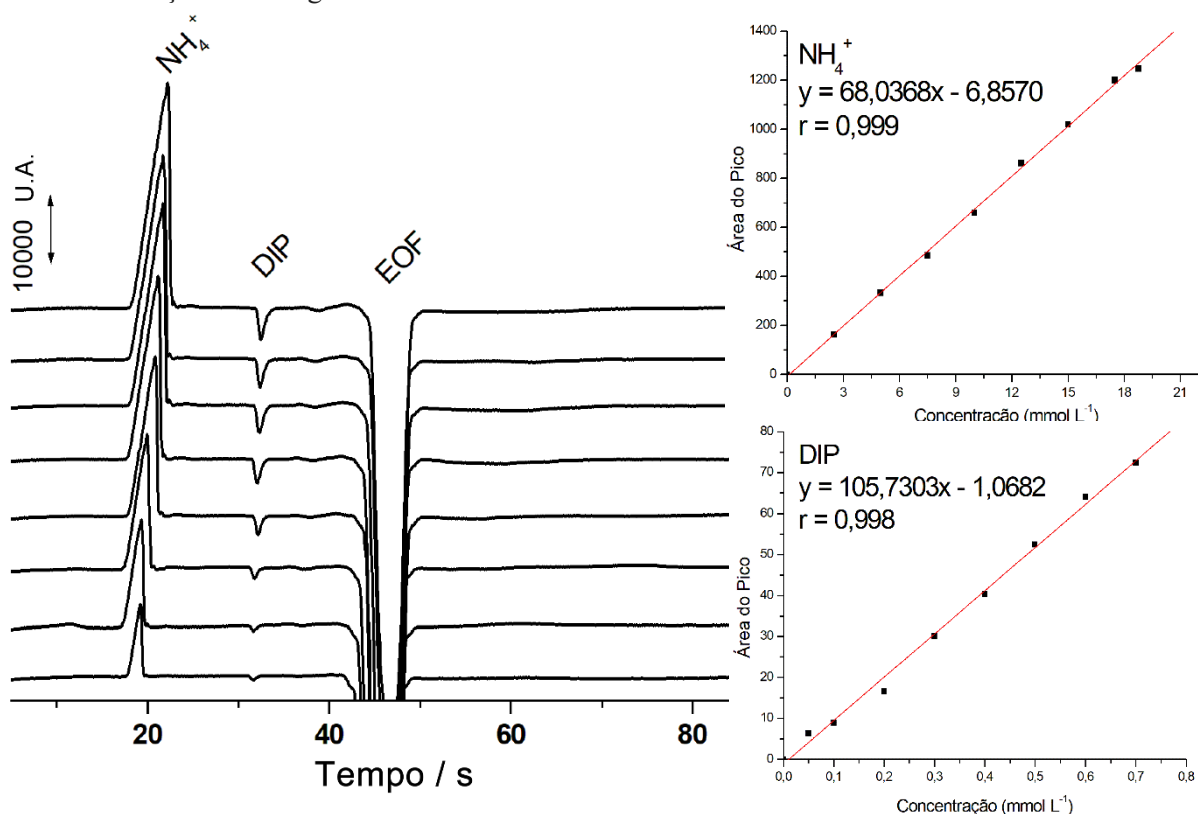
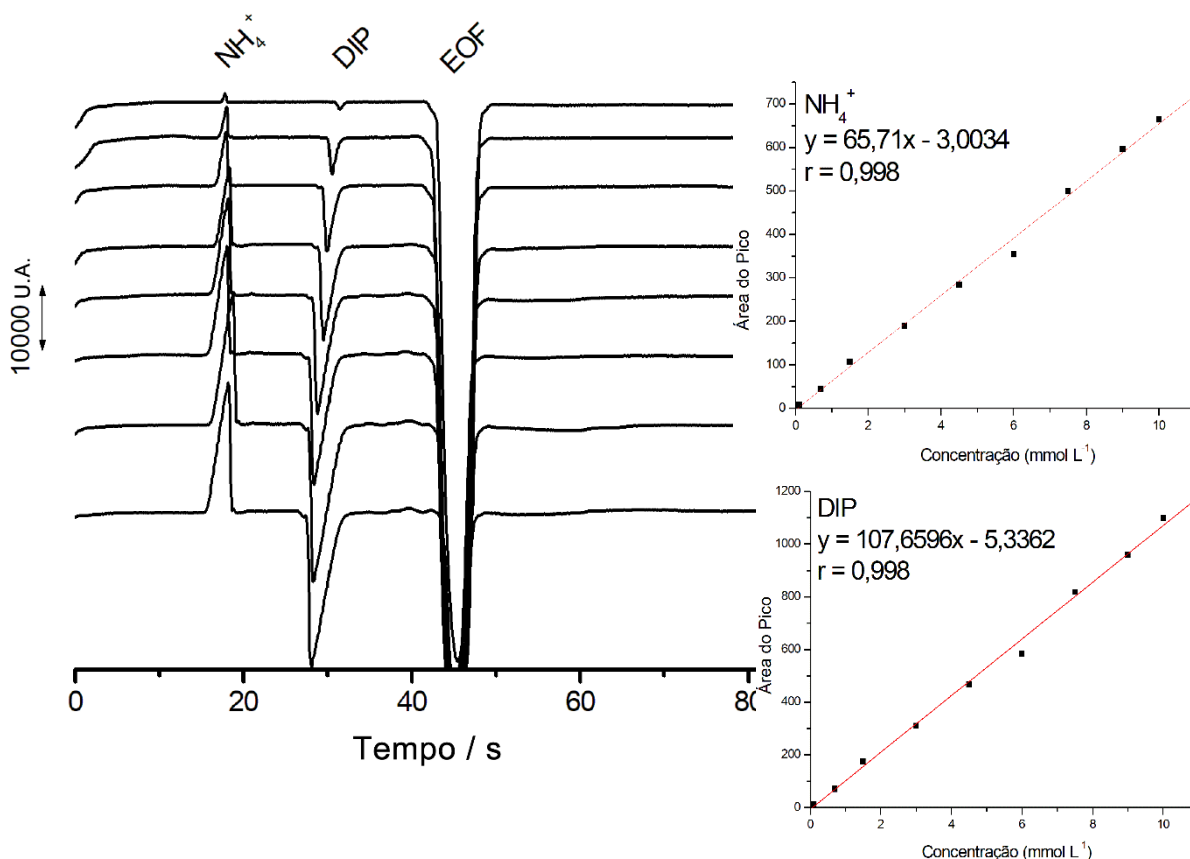


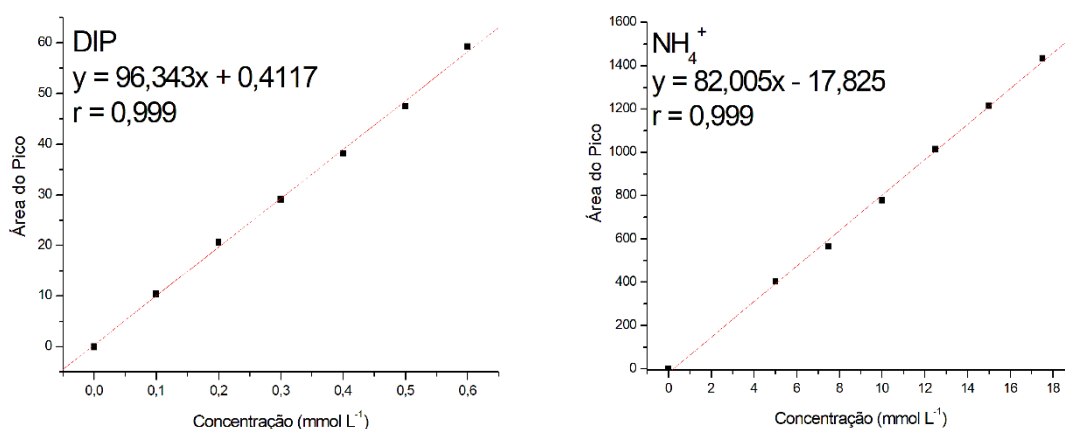
Figura 23. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões em concentrações crescentes de NH_4^+ e DIP ($0,1-10 \text{ mmol L}^{-1}$) e suas respectivas curvas analíticas. Demais condições vide Figura 20.



A partir da análise dos eletroferogramas e construção das curvas analíticas, conforme apresentados nas Figuras 22 e 23 para os íons, NH_4^+ e DIP apresentaram resposta linear entre concentração e condutividade em toda faixa de concentração avaliada ($R > 0,998$, nos dois casos), comprovando que o método desenvolvido apresenta uma ampla faixa linear de análise. Apesar de altas concentrações e diferença nas proporções dos analitos, o método se manteve eficiente e linear. Este comportamento é esperado por se tratar de um detector condutométrico, no qual deve-se ter em mente que o sinal analítico corresponderá a qualquer pequena variação da condutividade, além do método utilizar um BGE de baixa condutividade, evitando vazamentos significativos de sinal para escudos externos, fato provável em situações de alta condutividade [141]. Entre as duas maneiras de se determinar a faixa linear de resposta para os

analitos, Figuras 22 e 23, pode-se observar que apresentaram coeficientes de correlação linear praticamente idênticos, indicando que ambas as formas podem ser adotadas. Entre a faixa linear obtida para cada espécie, um intervalo de concentração menor foi usado na construção das curvas analíticas para cada composto. A Figura 24 ilustra as curvas analíticas dos respectivos analitos, as quais apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,999.

Figura 24. Curvas analíticas de NH_4^+ (5-17,5 mmol L^{-1}) e DIP (0,1-0,6 mmol L^{-1}).



A Tabela 4 contém as características analíticas do método obtidas pelas Figuras 21 e 24, entre estas características estão o LOD e LOQ calculados de forma experimental. Para a determinação dos valores de LOD foram realizadas injeções dos analitos (NH_4^+ e DIP) no equipamento, utilizando concentrações cada vez mais baixas, em uma diluição progressiva, até que não houvesse distinção entre o pico do analito e o ruído de fundo.

Tabela 4. Características analíticas do procedimento proposto CE-C⁴D (intervalo de confiança 95%).

Características Analíticas	NH ₄ ⁺	DIP
Tempo de migração (s)	23,8 ± 0,1	31,8 ± 0,1
Resolução	2,5 ± 0,2 ^a	3,6 ± 0,1 ^b
Coefficiente de Correlação	0,999	0,999
Linearidade (mmol L ⁻¹)	0,12-20,0	0,1-10,0
LOD (mg L ⁻¹)	0,72	5,10
LOQ (mg L ⁻¹)	2,16	15,30
Frequência de injeção (h ⁻¹)	90	90

Resolução entre os picos ^a NH₄⁺ e DIP, ^b DIP e EOF.

Os limites de detecção obtidos são adequados para quantificar e qualificar formulações farmacêuticas que contenham NH₄⁺ e DIP, já que princípios ativos estão presentes em alta concentração em amostras farmacêuticas. Os eletroferogramas obtidos a partir de injeções de soluções com amostras distintas apresentaram perfis semelhantes, conforme ilustrados na Figura 25. É observado que o pico do sódio em cada amostra apresentou resolução adequada com o pico do NH₄⁺ usando o BGE otimizado. Para garantir a exatidão do método, as amostras farmacêuticas também foram analisadas por HPLC para determinação de DIP e pelo método de Kjeldahl para a determinação de NH₄⁺. Os resultados obtidos com os procedimentos de referência foram estatisticamente similares ao método proposto com 95% de probabilidade (Tabela 5).

Figura 25. Eletroferogramas obtidos a partir da introdução de três soluções de amostras comerciais distintas contendo NH_4^+ (10 mmol L^{-1}) e DIP ($200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições vide figura 20.

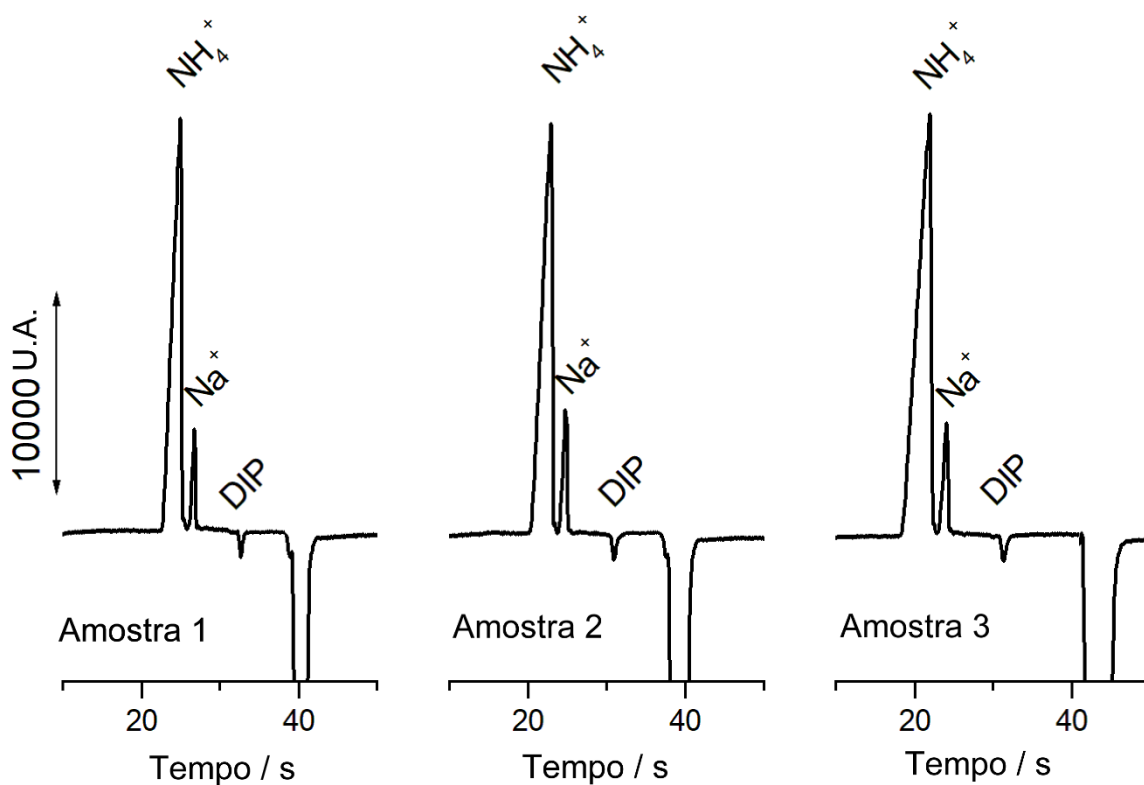


Tabela 5. Determinação de DIP e NH_4^+ em amostras farmacêuticas pelo método proposto CE-C⁴D e pelos métodos de comparação.

Amostra		Diferença relativa					
		Bula (mg/pastilha)	HPLC (mg/pastilha)	Kjeldahl (mg/pastilha)	CE-C ⁴ D (mg/pastilha)	E ₁	E ₂
AM 1	NH_4^+	50	-	$49,3 \pm 4,3$	$48,4 \pm 2,2$	+3,2	+1,8
	DIP	5	$5,0 \pm 0,1$	-	$4,9 \pm 0,1$	+1,2	+1,6
AM 2	NH_4^+	50	-	$48,6 \pm 2,7$	$48,7 \pm 0,4$	+2,8	-0,2
	DIP	5	$4,9 \pm 0,6$	-	$4,9 \pm 0,6$	+2,0	+1,6
AM 3	NH_4^+	50	-	$48,4 \pm 2,6$	$48,6 \pm 3,2$	+3,2	+0,4
	DIP	5	$5,0 \pm 0,1$	-	$4,6 \pm 0,4$	+7,8	+7,8

E₁: diferença entre os resultados obtidos pelo CE-C⁴D e os valores da bula; E₂: diferença entre os resultados obtidos pelo CE-C⁴D e pelo método de comparação.

Além da comparação dos resultados obtidos por HPLC e pelo método de Kjeldahl, a exatidão do método proposto também foi avaliada através do estudo de adição e recuperação em amostras farmacêuticas. Nesta etapa as amostras foram diluídas adequadamente, e analisadas sem e com adição de concentrações conhecidas de NH_4^+ e DIP. Os valores de recuperação obtidos ($n = 3$) indicam que não há efeito de matriz nos resultados de recuperação dos princípios ativos na amostra, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de recuperação de NH_4^+ e DIP em amostras farmacêuticas, devidamente diluídas ($n = 3$).

Amostra	Analitos	Analisada (mmol L ⁻¹)	Adicionada (mmol L ⁻¹)	Encontrada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
AM 1	NH_4^+	9,85 ± 0,12	5,00	14,81 ± 0,20	100 ± 1
	DIP	0,19 ± 0,01	0,20	0,41 ± 0,04	103 ± 6
AM 2	NH_4^+	10,17 ± 0,36	5,00	14,31 ± 0,36	95 ± 1
	DIP	0,18 ± 0,01	0,20	0,38 ± 0,03	99 ± 2
AM 3	NH_4^+	10,40 ± 0,03	5,00	15,78 ± 0,34	102 ± 1
	DIP	0,19 ± 0,01	0,20	0,41 ± 0,03	104 ± 2

Os resultados obtidos pelo método proposto estão de acordo com os obtidos por HPLC e pelo método de Kjeldahl em nível de confiança de 95%, onde os valores de t calculados (*test t-Student*, pareado) foram menores que o valor crítico teórico (2,40; $N=3$), confirmando que não há diferenças estatisticamente significativas entre os resultados.

O método proposto é cerca de 20 vezes mais rápido que os métodos de comparação (HPLC e Kjeldahl) e tem o valor de LOD melhor para NH_4^+ (0,04 mmol L⁻¹) que o método de Kjeldahl (LOD = 1,4 mmol L⁻¹). O LOD do método HPLC (LOD = 0,001 mmol L⁻¹) [41] é melhor que o do método proposto CE (LOD = 0,02 mmol L⁻¹), entretanto, para determinação de DIP em formulações farmacêuticas o valor de LOD obtido para o método não é uma limitação. O procedimento proposto possui características analíticas adequadas para a determinação simultânea e confiabilidade nos resultados obtidos.

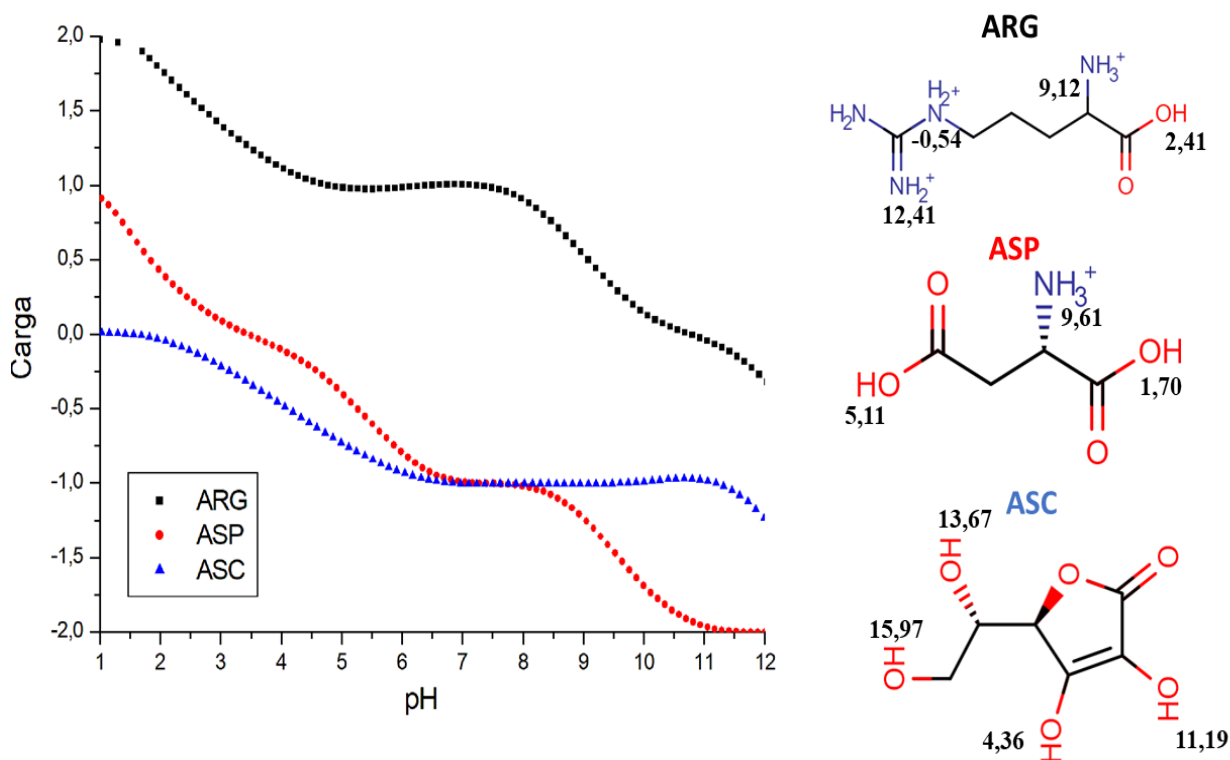
Conclusões parciais

O método CE-C⁴D proposto foi aplicado de forma bem sucedida na determinação simultânea de NH₄⁺ e DIP em amostras farmacêuticas. A estratégia apresentada supera a limitação de outras técnicas analíticas na determinação de NH₄⁺ e DIP em uma mesma corrida, sem procedimentos de derivação. Além disso, o sistema CE-C⁴D oferece amplas faixas lineares, o que torna possível a aplicação em analitos que estão presentes em proporções muito diferentes, como DIP e NH₄⁺ (1:50). O método proposto é mais rápido (menos de um minuto) que os procedimentos de comparação e consome pequenos volumes de amostra e reagentes, o que o torna uma alternativa viável (eco-friendly) e interessante para o controle de qualidade em formulações farmacêuticas.

4.2 Determinação simultânea de arginina (ARG), aspartato (ASP) e ácido ascórbico (ASC)

Com o objetivo de prosseguir os estudos de determinação de fármacos em formulações farmacêuticas, optou-se por desenvolver um método de análise de fármacos em formulações que contenham as espécies ARG ($pK_a = 2,41; 9,12$ e $12,41$), ASP ($pK_a = 1,7; 5,11$ e $9,61$) e ASC ($pK_a = 4,36; 11,19$) [5]. A Figura 26 ilustra as fórmulas estruturais das moléculas ARG, ASP e ASC e suas respectivas curvas da relação carga e pH da solução.

Figura 26. Fórmulas estruturais com valores de pK_a da ARG, ASP e ASC e suas curvas de distribuição de carga em função do pH.



Pelos valores de pK_a apresentados na Figura 26, os compostos podem existir em forma iônica em soluções aquosas, ou seja, é possível a separação das espécies por CZE. As espécies ARG e ASP podem existir na forma catiônica ou aniônica, já o ASC apenas na forma aniônica. No intervalo de pH (4-10) comumente usado em CZE, é possível observar na Figura 25 que a

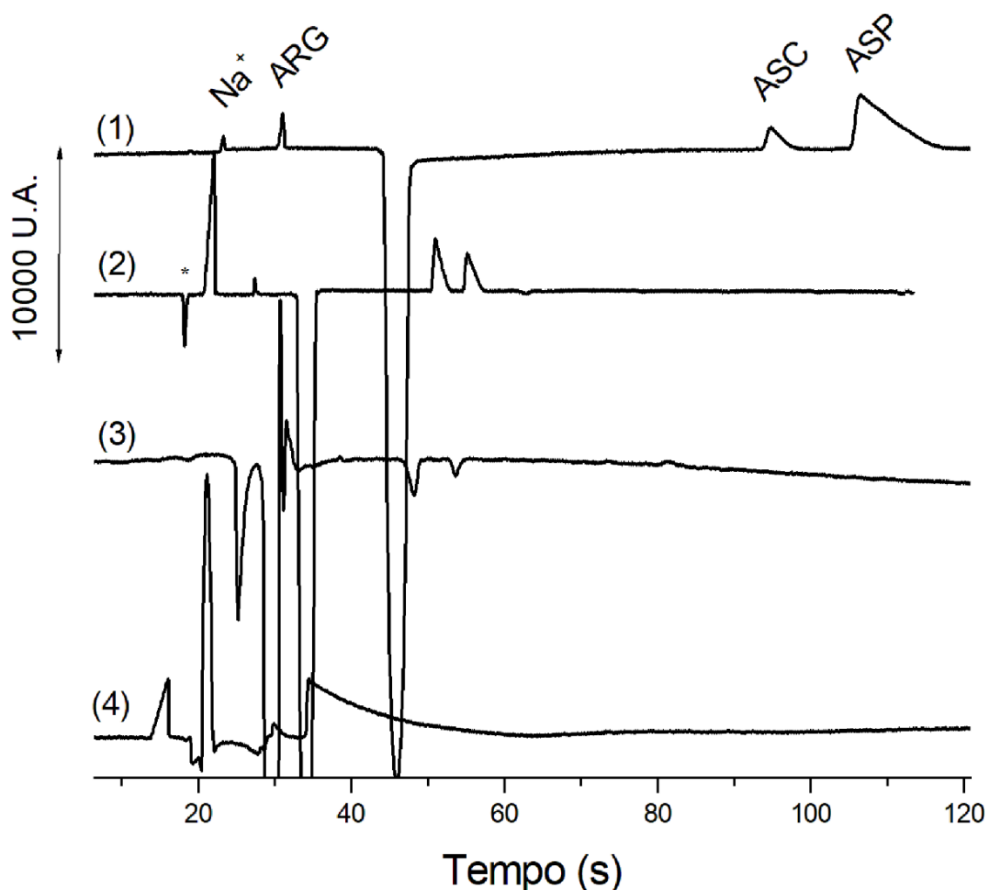
molécula ARG é indicada como cátion e as moléculas ASP e ASC como ânions. Para que a determinação dessas três espécies em uma única corrida seja possível, uma estratégia que permita a determinação simultânea de cátions e ânions foi selecionada. A opção foi pelo uso do EOF normal em alta magnitude ($\text{pH} \geq 7,5$, desprotonação total dos grupos silanóis da sílica fundida), condição na qual os cátions são rapidamente transportados para o detector no modo co-EOF ($\mu_{\text{cof}} + \mu_{\text{ef}}$) e os ânions (normalmente de baixa mobilidade) no modo contra o EOF ($\mu_{\text{cof}} - \mu_{\text{ef}}$) serão transportados em uma velocidade menor, sendo detectados após o EOF (tempo de migração das moléculas neutras).

O primeiro estudo para determinação simultânea dos três compostos por CZE se iniciou com a escolha da composição do BGE. Este estudo foi realizado visando a identificação de um BGE que: (i) garanta a manutenção do pH em valor constante para que a mobilidade das espécies em análise se mantenham constantes; (ii) proporcione mobilidades diferentes (tempos de migração diferentes) para as espécies em análise para que a separação e detecção seja possível. Simulações empregando o software Peakmaster [155] foram realizadas para estimar quais BGEs apresentariam potencial para separação e detecção das espécies em interesse.

A Figura 27 ilustra a influência de diferentes BGEs na separação e detecção da ARG, ASC e ASP. Na condição 27.1, no BGE composto por 20 mmol L⁻¹ MES/ 20 mmol L⁻¹ HIS (pH = 6,0) o EOF não se encontra em sua maior velocidade, portanto, o maior tempo de análise entre os BGEs estudados foi verificado nesta condição. A condição 27.2 (BGE: 20 mmol L⁻¹ TRIS/ 20 mmol L⁻¹ TAPS, pH=8,3) é caracterizada por um menor tempo de análise e por uma boa resolução ($R_s > 1,2$) entre os picos das espécies de interesse, porém, nesta condição a condutividade de ARG é semelhante à do BGE, gerando um sinal positivo de baixa intensidade, dificultando sua determinação. A condição 27.3 (BGE: 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH ajustado em 8,5 com NaOH) apresentou sensibilidade adequada para ARG e tempo de análise semelhante à condição 27.2, porém, uma menor sensibilidade foi obtida para os picos do ASC

e ASP. Na condição 27.4, BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de β – alanina com pH ajustado em 9,7 com NaOH, as espécies de interesse apresentaram-se como bons picos com longas caudas, que prejudicou na resolução dos compostos.

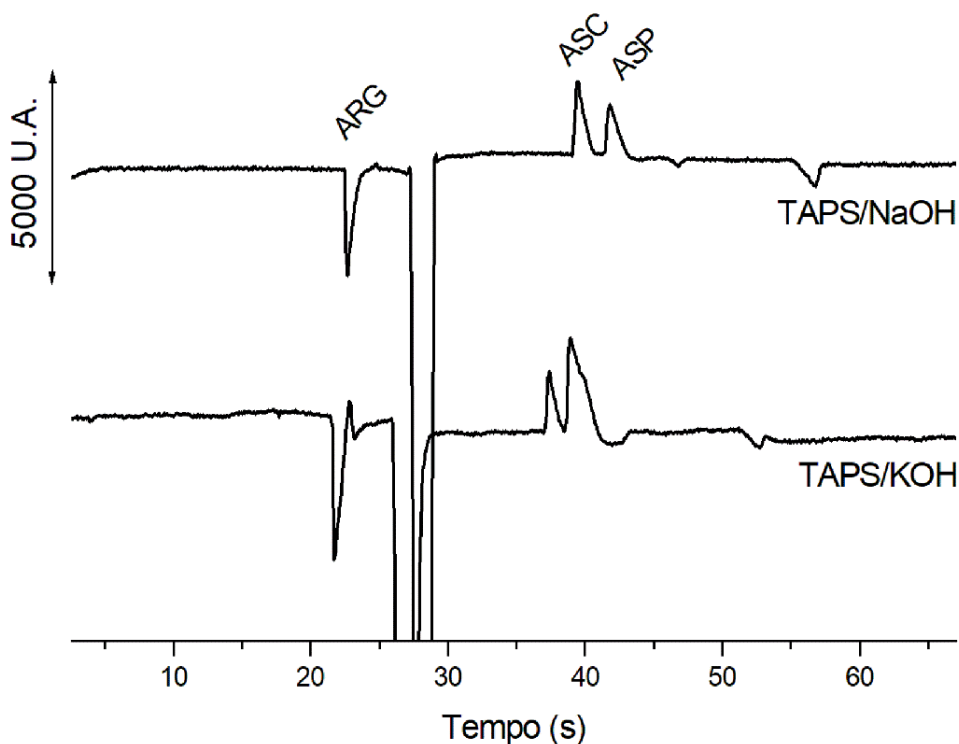
Figura 27. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG, ASP e ASC (700 μ mol L⁻¹ cada) usando os seguintes BGE's: (1) 20 mmol L⁻¹ MES/ 20 mmol L⁻¹ HIS (pH=6,0); (2) 20 mmol L⁻¹ TRIS/ 20 mmol L⁻¹ TAPS (pH=8,3); (3) 20 mmol L⁻¹ de ácido bórico com pH ajustado em 8,5 com NaOH,; (4) 20 mmol L⁻¹ β – alanina com pH ajustado em 9,7 com NaOH. Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: 50 μ m.



Nos estudos seguintes, o objetivo foi encontrar um BGE que proporcionasse uma melhor sensibilidade para ARG sem comprometer a sensibilidade de ASC e ASP. Como o BGE

27.2 formado por TRIS/TAPS pH=8,3 apresentou bons resultados, exceto na sensibilidade da ARG, estudos foram realizados com BGEs compostos por TAPS e contra-íons de alta mobilidade. O objetivo foi aumentar a condutividade do BGE e, consequentemente aumentar a detectabilidade da ARG, sem comprometer a sensibilidade e resolução das demais espécies de interesse. A Figura 28 exibe os eletroferogramas obtidos nos estudos com TAPS.

Figura 28. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG, ASP e ASC (700 $\mu\text{mol L}^{-1}$ cada) usando: 10 mmol L^{-1} TAPS/ 5 mmol L^{-1} NaOH (pH=8,3) ou 10 mmol L^{-1} TAPS/ 5 mmol L^{-1} KOH (pH=8,3) como BGEs. Demais condições: EOF normal; potencial aplicado: +25 kV (lado da injeção), comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s, diâmetro interno do capilar: 50 μm .

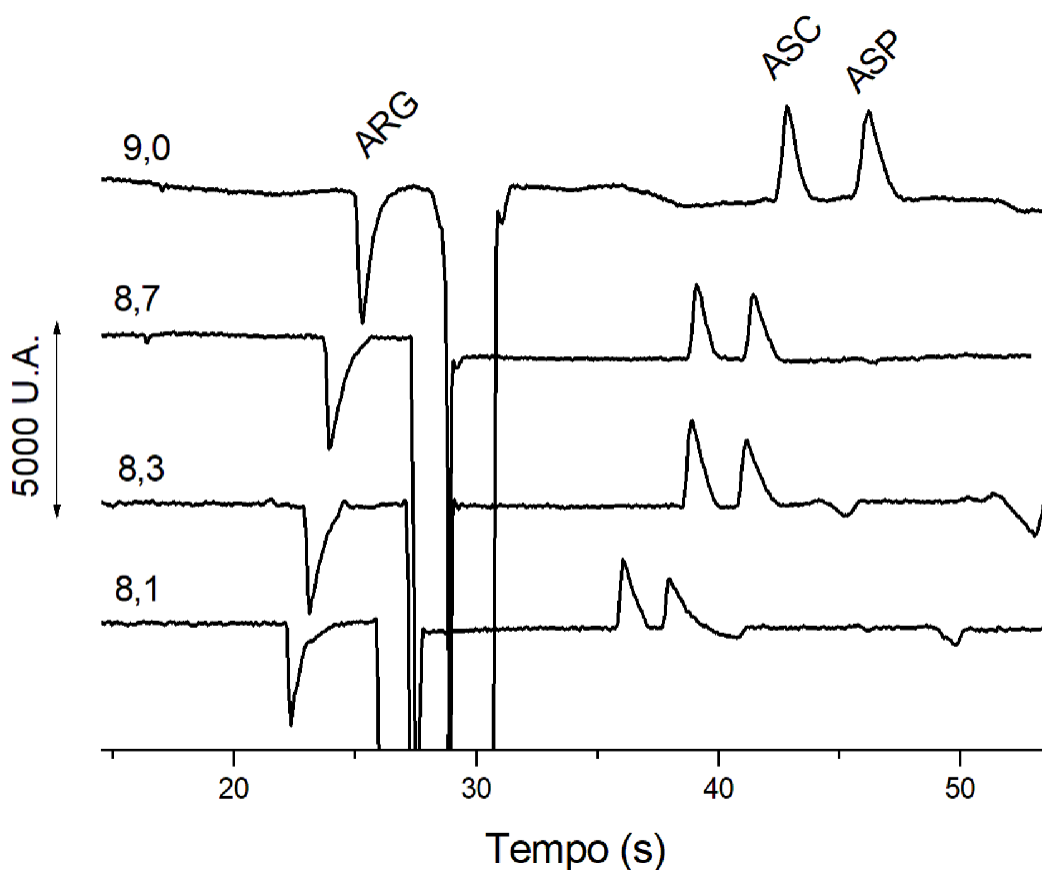


Os BGEs compostos por TAPS + NaOH e TAPS + KOH influenciaram de forma positiva a detectabilidade da ARG sem afetar a sensibilidade do ASC e ASP de modo

significante (BGEs com mobilidade intermediária). No BGE composto por TAPS + NaOH, as espécies aniônicas apresentaram melhor resolução ($R_s = 1,3$) do que no BGE composto por TAPS + KOH ($R_s = 0,6$). Assim, a composição TAPS + NaOH foi escolhida como BGE para prosseguir com os estudos.

Após a escolha da composição do BGE, o próximo estudo consistiu em encontrar o pH adequado do BGE em que as espécies de interesse apresentariam melhor comportamento. A Figura 29 exibe eletroferogramas obtidos com as soluções contendo os analitos ARG, ASP e ASC em BGEs compostos por TAPS + NaOH com diferentes pH's.

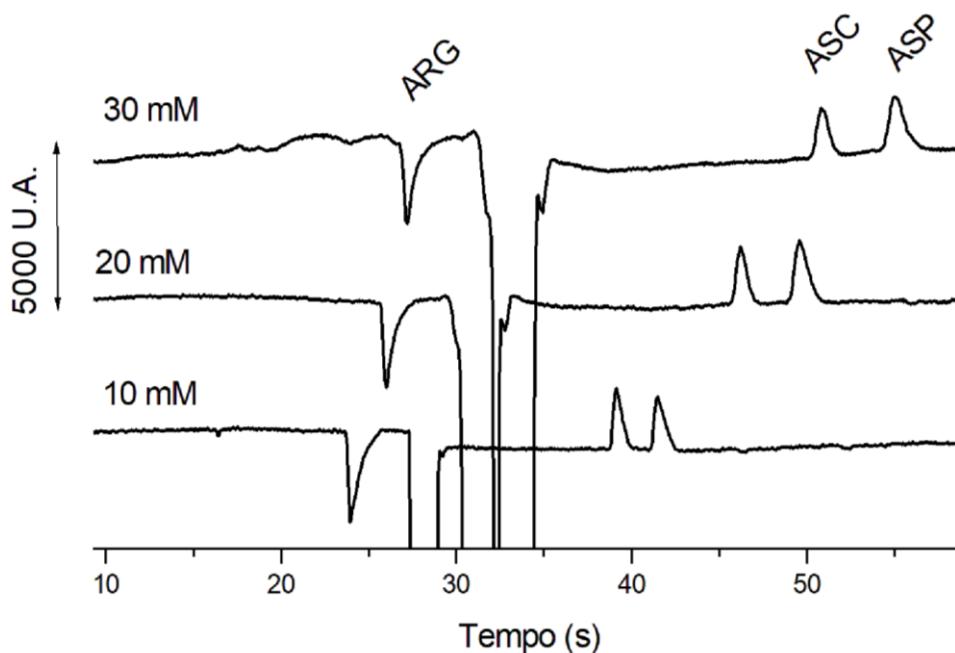
Figura 29. Estudo do pH utilizando uma solução padrão contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 10 mmol L^{-1} de TAPS + NaOH com pH variando de 8,1 – 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal.



Ao analisar os resultados apresentados na Figura 29 observou-se que com o aumento do pH do BGE, a intensidade do pico da ARG também aumentou. Isto pode ser explicado pelo equilíbrio da ARG ($pK_a = 9,12$) o intervalo de pH estudado. Quanto mais elevado o pH do BGE, maior será o número de moléculas neutras no equilíbrio em relação às moléculas carregadas (Figura 26), assim, a condutividade do analito diminui e consequentemente a detectabilidade aumenta. Além de influenciar a detectabilidade, a mudança de pH também influencia o tempo de migração da ARG (base fraca). Quanto maior o pH do BGE, maior o número de moléculas neutras no equilíbrio e, consequentemente, a mobilidade eletroforética vai diminuindo aproximando o pico da ARG ao EOF. Um cenário semelhante pode ser observado em relação ao ASP, pois o intervalo de pH estudado também está próximo ao pK_a da molécula (9,61). Quanto maior o pH do BGE, maior o número de moléculas carregadas (ácido fraco; Figura 26), maior a condutividade do ASP e maior sua detectabilidade, justificando o comportamento experimental observado. O tempo de migração do ASP também é afetado pelo pH, pois com o aumento do pH do BGE, mais espécies de ASP terão carga e maior será sua mobilidade eletroforética e maior será seu tempo de migração. Como a faixa de pH estudada está distante dos pK_a s do ASC (4,4 e 11,2; Fig. 26), o tempo de migração do ASC permaneceu relativamente constante e, assim, uma melhor separação entre ASC e ASP foi observada com o aumento do pH do BGE.

O BGE de $pH=9,0$ apresentou maior sensibilidade e melhor resolução, todavia, como desvantagens podemos citar a linha base instável e maior tempo de análise. Em $pH = 8,7$ resultou-se em separação com boa resolução e sensibilidades inferiores ao BGE de valor 9,0, porém, teve ganhos em relação a estabilidade da linha base e tempo de análise. Portanto, o BGE com $pH = 8,7$ foi selecionado para os demais estudos. No estudo seguinte, a concentração do TAPS na composição do BGE foi investigada, sendo que os resultados obtidos são apresentados na Figura 30.

Figura 30. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG (290 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ASC (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP (290 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: TAPS (10; 20; 30 mmol L^{-1}) pH = 8,7, ajustado com NaOH. Demais condições: Vide figura 27.

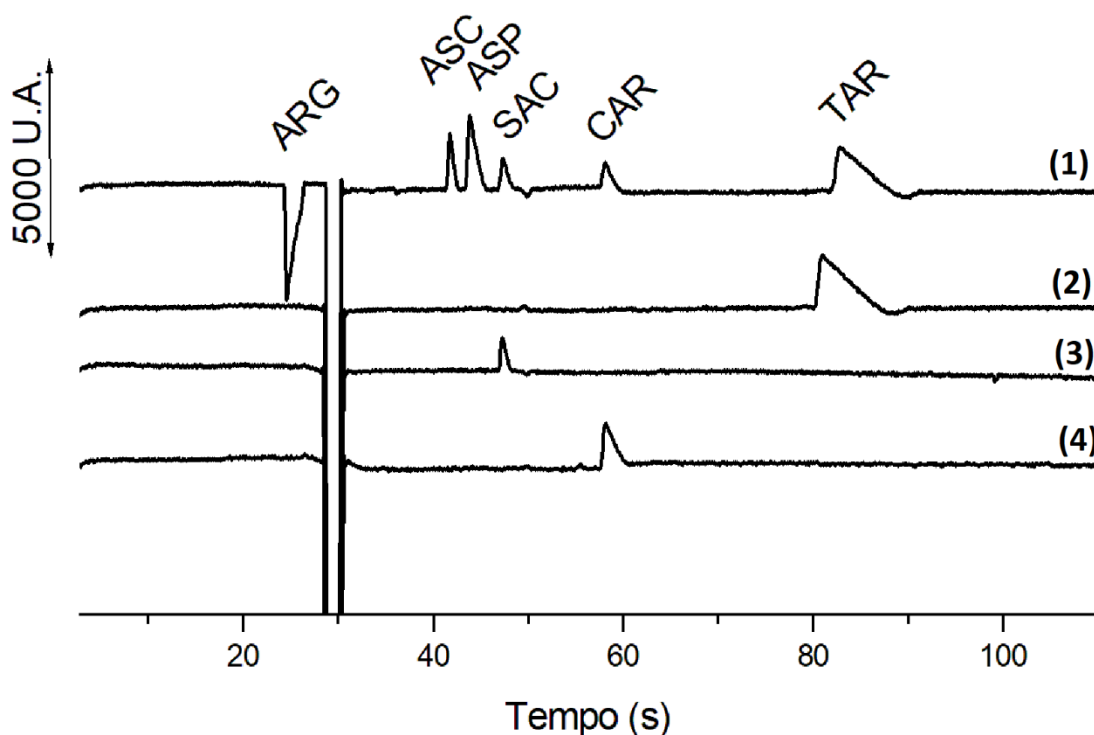


A elevação da concentração do BGE aumenta a força iônica da solução, interferindo na composição da dupla camada elétrica (potencial zeta) e, afetando, portanto, a velocidade do EOF. Assim, a velocidade da análise e resolução também são afetados. Na condição 30 mM TAPS + 15 mM NaOH obteve-se a melhor resolução ($R_s = 2,2$) e o maior tempo de análise (58 s). Na condição 10 mM TAPS + 5 NaOH ocorreu o inverso, menor resolução ($R_s = 1,6$) e menor tempo de análise (43 s). Em função disto, o BGE composto por 20 mM TAPS + 10 mM NaOH foi selecionado para os estudos seguintes, pois este BGE oferece tempo de análise (51 s) e resolução ($R_s = 1,9$) adequados para a quantificação e separação dos compostos estudados.

Após a otimização da composição do BGE, estudos foram realizados com o intuito de verificar se os excipientes normalmente encontrados nas amostras comerciais serão potenciais interferentes. Medicamentos contendo ARG, ASC e ASP em suas formulações são produzidos por diversos laboratórios, portanto, esses três compostos são encontrados em matrizes variadas.

Deste modo, percebeu-se a importância do estudo, garantindo que o método é eficiente em qualquer possível situação. A Figura 31 ilustra eletroferogramas dos princípios ativos na presença de possíveis excipientes inativos, como sacarina (SAC), carbonato de sódio (CAR) e ácido tartárico (TAR).

Figura 31. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões contendo (1) ARG (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ASC (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ASP (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$), SAC (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), CAR (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e TAR (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (2) TAR (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (3) SAC (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e (4) CAR (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: TAPS (20mmol L^{-1}) com pH = 8,7, ajustado com NaOH. Demais condições: Vide Figura 28.



A Figura 31 confirma que os possíveis excipientes não serão interferentes na determinação de ARG, ASC e ASP em formulações farmacêuticas utilizando o BGE otimizado, ou seja, o método apresenta seletividade adequada para a determinação de ARG, ASC e ASP em quaisquer condições de formulações farmacêuticas.

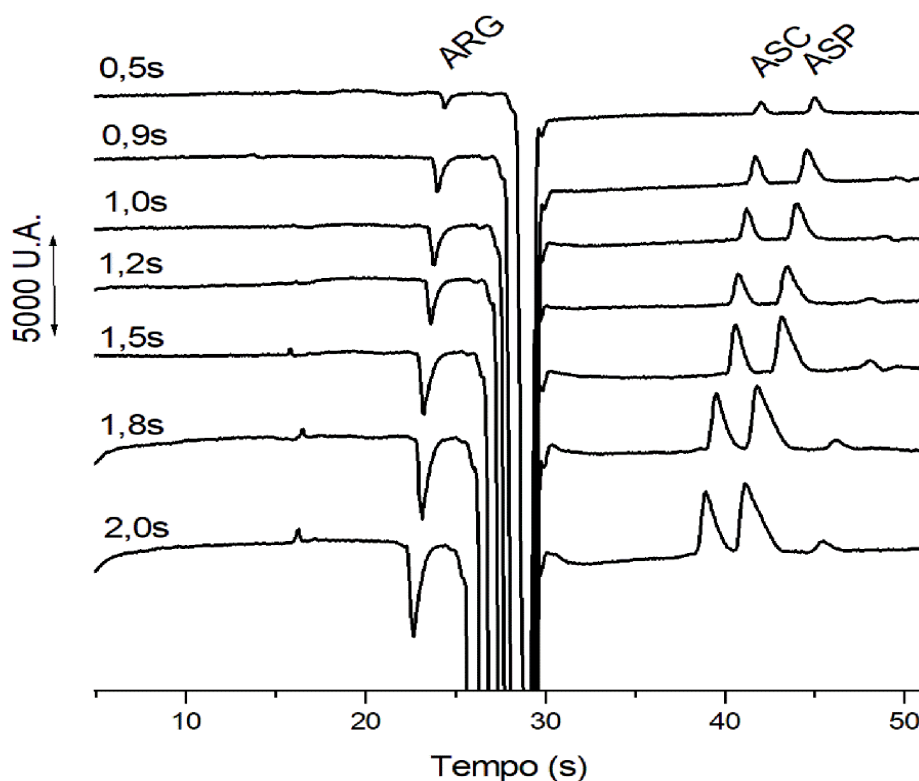
Posteriormente, estudos foram realizados para avaliar alguns parâmetros relacionados com o equipamento de CE- C^4D : tempo de injeção (Figura 32), potencial de separação e

temperatura. As melhores condições experimentais para a determinação de ARG, ASC e ASP estão disponibilizadas na Tabela 7. Tempo de injeção tem como objetivo o ganho de sensibilidade sem afetar a resolução entre ARG e EOF e entre ASC e ASP.

Tabela 7. Condições otimizadas do método proposto CE-C⁴D.

Parâmetros	Faixa avaliada	Valor otimizado
Concentração do BGE (mmol L ⁻¹)	10-30	20
pH do BGE	8,1-9,0	8,7
Potencial de separação (kV)	15-25	25
Tempo de injeção (s) (25 kPa)	0,5-2,0	1,0
Temperatura (°C)	20-30	25

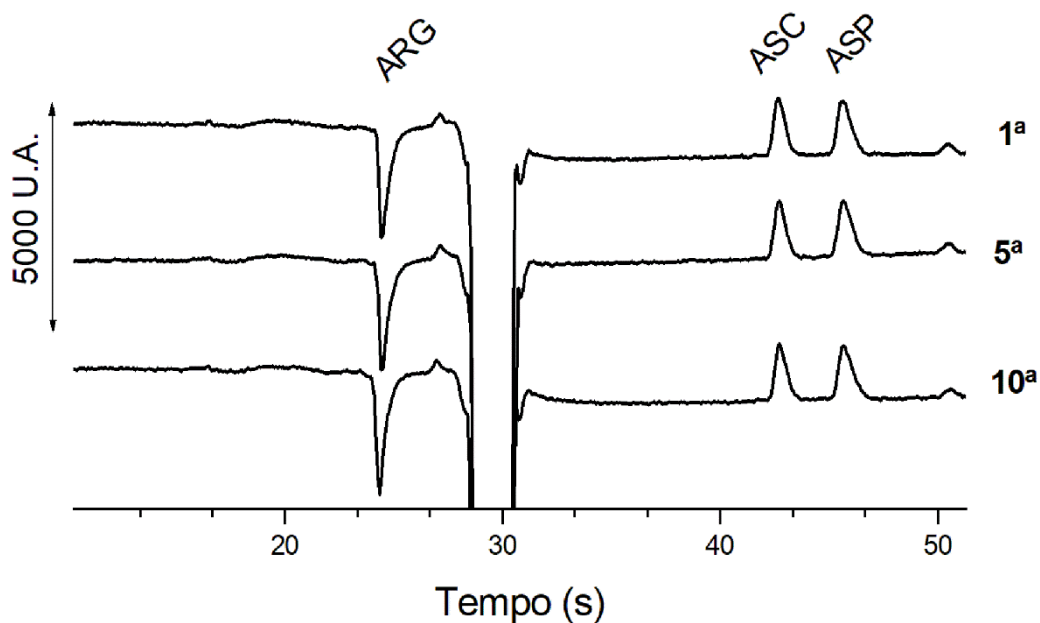
Figura 32. Estudo do tempo de injeção utilizando uma solução padrão contendo ARG (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ASC (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L⁻¹ de TAPS + 10 mmol L⁻¹ de NaOH, pH = 8,7. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 – 2,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; EOF: normal



Conforme pode ser observado na Figura 32, com o aumento do tempo de injeção, as áreas dos picos aumentam significativamente, porém a resolução é afetada de forma inversa. Assim, para garantir que o estudo da linearidade não seja comprometido com a perda de resolução entre ASC e ASP, o tempo de injeção de 1,0 s foi escolhido para prosseguir com os estudos de desenvolvimento do método.

Com os parâmetros experimentais definidos, procedeu-se com o estudo de repetibilidade do tempo de migração e da área de pico dos compostos intra-dia e inter-dia para testar a estabilidade do sistema. O desempenho do sistema neste estudo é mostrado na Figura 33, onde eletroferogramas de dez injeções sucessivas de uma solução amostra, adequadamente diluída em água, são apresentadas. Neste estudo, RSDs < 2,9% para os tempos de migração e para as áreas dos picos dos compostos foram obtidos. No estudo inter-dias foram feitas injeções da solução amostra em três dias distintos, apresentando RSDs < 5,7%, ou seja, a repetibilidade do método é adequada mesmo em dias diferentes, podendo o analista optar por fazer ou não a calibração do método diariamente. No entanto, se o objetivo for a obtenção de maior exatidão dos resultados é recomendado a calibração diária, já que os desvios intra-dias são menores que os desvios inter-dias.

Figura 33. Estudo da repetibilidade com dez injeções sucessivas de uma solução amostra contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$). BGE: 20 mmol L^{-1} de TAPS + 10 mmol L^{-1} de NaOH, $\text{pH} = 8,7$. Injeção hidrodinâmica: $25 \text{ kPa } 1,0 \text{ s}$; Potencial de separação: $+25 \text{ kV}$ (lado da injeção); Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm , respectivamente; EOF: normal.



Após os estudos de otimização de parâmetros como concentração e pH do BGE, tempo de injeção e potencial de separação e a obtenção de resultados satisfatórios no estudo de repetibilidade, as faixas lineares de resposta da ARG, do ASC e do ASP foram investigadas. A Figura 34 mostra os eletroferogramas obtidos a partir de injeções de soluções padrões contendo concentrações crescentes dos analitos em estudo. Neste estudo, as proporções entre as espécies em estudo foram similares às encontradas em amostras farmacêuticas comerciais: 1:1,7:1 (ARG: ASC: ASP). As curvas de calibração (Figura 35) foram construídas a partir da faixa linear e apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,997, 0,997 e 0,999 para ARG, ASC e ASP, respectivamente.

Figura 34. Eletroferogramas obtidos a partir de soluções padrões em concentrações crescentes ARG (80-730 $\mu\text{mol L}^{-1}$), ASC (100-750 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP (80-730 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições vide figura 32.

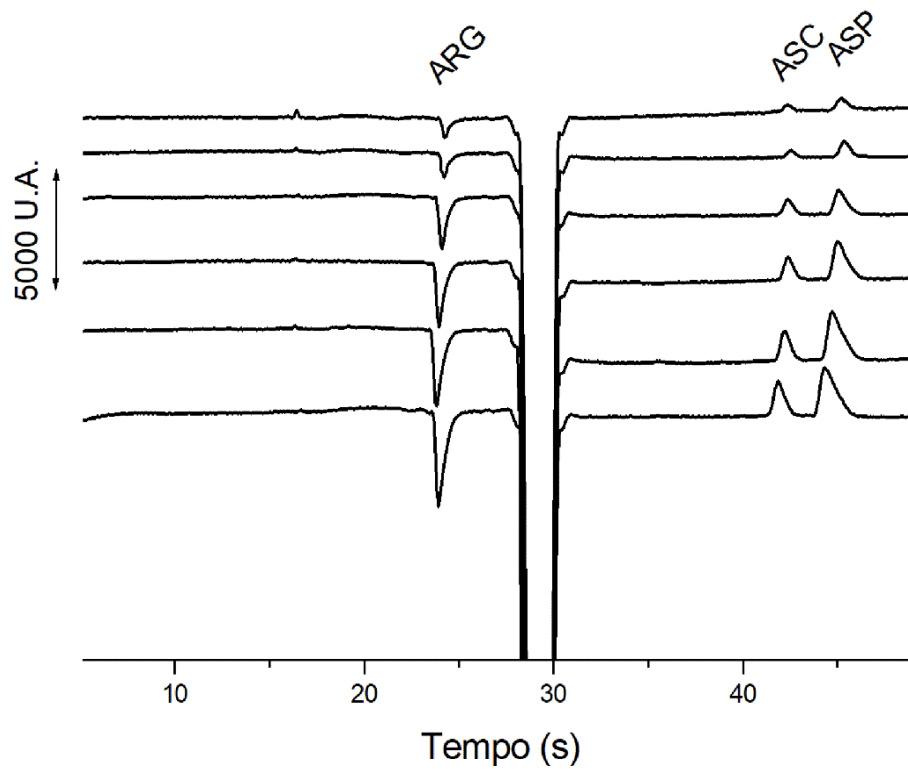
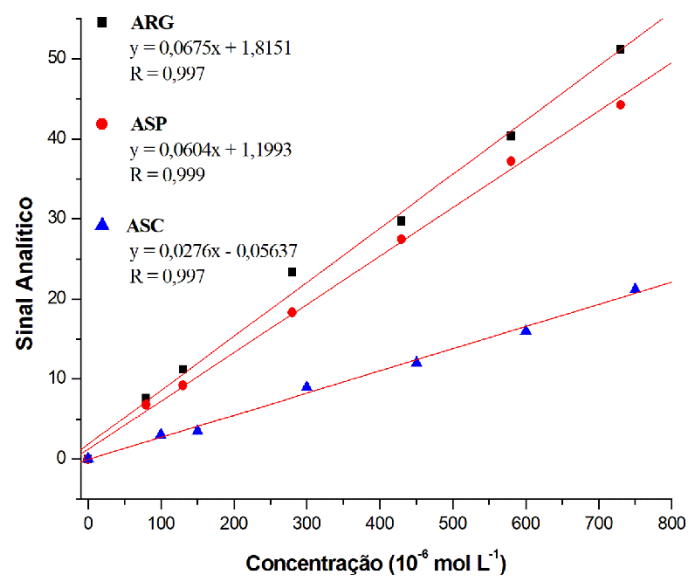


Figura 35. Curvas analíticas da ARG, ASC e ASP.



A Tabela 8 mostra um resumo das características analíticas do método proposto obtidas pelas Figuras 33 e 34, entre estas características estão o LOD e LOQ calculados de forma experimental, por apresentar resultados mais próximos da realidade e valores de RSD para as áreas de pico.

Tabela 8. Características analíticas do método proposto CE-C⁴D (intervalo de confiança 95%).

Características Analíticas	ARG	ASC	ASP
Tempo de Migração (s)	24,4± 0,1	42,7± 0,1	45,7± 0,1
Resolução	2,4± 0,2 ^c	5,4± 0,1 ^d	1,8± 0,1 ^e
LOD (mmol L ⁻¹)	0,01	0,035	0,02
LOQ (mmol L ⁻¹)	0,03	0,11	0,04
Faixa linear (μmol L ⁻¹)	80-730	100-750	80-730
Coefficiente de correlação	0,996	0,997	0,999
Frequência de injeção (h ⁻¹)	78	78	78
Intra-dia RSD (n=10)	2,9%	2,8%	2,6%
Inter-dia RSD (n=3)	2,3%	5,7%	2,7%

Resolução entre ^c ARG e EOF, ^d EOF e ASC e ^e ASC e ASP.

Os limites de detecção obtidos são adequados para fazer o controle de qualidade de formulações farmacêuticas que contenham ARG, ASC e ASP, já que estes princípios ativos estão presentes de forma majoritária em amostras farmacêuticas comerciais. Os eletroferogramas obtidos a partir de soluções de padrões e amostras apresentam perfis semelhantes, conforme apresentado na Figura 35, indicando que os excipientes na amostra não interferem no sinal obtido pelos princípios ativos.

Para obter informações sobre a exatidão do método, as amostras farmacêuticas foram analisadas por HPLC para determinação de ARG, por iodometria para a determinação de ASC

e através da titulação ácido-base para ASP. Os resultados obtidos com os procedimentos de referência foram estatisticamente similares ao método proposto com 95% de nível de confiança (Tabela 9).

Figura 36. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de três soluções padrões e amostras comerciais distintas contendo ARG ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$), ASC ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$) e ASP ($290 \mu\text{mol L}^{-1}$). Demais condições vide figura 30.

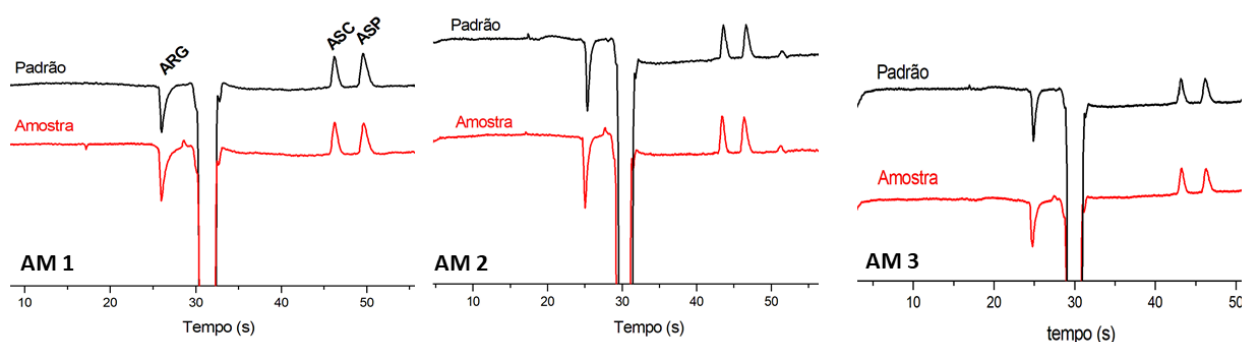


Tabela 9. Determinação de ARG, ASC e ASP em amostras farmacêuticas pelo método proposto CE-C⁴D e os valores de recuperação de cada amostra.

Amostra							Diferença Relativa	
		Bula (g/pastilha)	CE-C ⁴ D (g/pastilha)	HPLC	Iodometria	Titulação ácido-base	E ₁ (%)	E ₂ (%)
AM 1	ARG	0,57	0,58±0,01	0,60±0,02	-	-	-1,75	+3,3
	ASC	1,0	1,03±0,04	-	1,04±0,04	-	-3	+1
	ASP	0,43	0,44±0,02	-	-	0,44±0,06	-2,3	-
AM 2	ARG	0,57	0,58±0,01	0,59±0,01	-	-	-1,75	+1,7
	ASC	1,0	1,04±0,03	-	1,04±0,04	-	-4	-
	ASP	0,43	0,43±0,01	-	-	0,45±0,03	-	-
AM 3	ARG	0,57	0,59±0,02	0,60±0,01	-	-	-3,5	+1,6
	ASC	1,0	1,03±0,03	-	1,04±0,08	-	-3	+1
	ASP	0,43	0,43±0,01	-	-	0,43±0,02	-	-

E1: diferença entre os resultados obtidos pelo CE-C⁴D e os valores da bula; E2: diferença entre os resultados obtidos pelo CE-C⁴D e pelo método de comparação.

Para obter maiores informações sobre a exatidão do método, amostras farmacêuticas também foram diluídas adequadamente, e analisadas sem e com adição de concentrações conhecidas de ARG, ASC e ASP (estudo de adição e recuperação). Os valores de recuperação obtidos (n=3) indicam que não há efeito de matriz de forma significativa conforme pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de recuperação para a análise de amostras farmacêuticas devidamente diluídas (n = 3).

Amostra	Analitos	Analizada (mmol L ⁻¹)	Adicionada (mmol L ⁻¹)	Encontrada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
AM 1	ARG	0,29±0,01	200	0,50±0,01	101±3
	ASC	0,52±0,02	200	0,74±0,01	102±2
	ASP	0,29±0,01	200	0,50±0,01	103±1
AM 2	ARG	0,29±0,01	300	0,63±0,01	104±1
	ASC	0,52±0,02	300	0,84±0,01	101±1
	ASP	0,28±0,02	300	0,61±0,01	105±2
AM 3	ARG	0,29±0,01	200	0,51±0,01	104±2
	ASC	0,53±0,02	200	0,73±0,01	100±2
	ASP	0,31±0,01	200	0,52±0,01	101±1

Os resultados obtidos pelo procedimento proposto são similares às concentrações descritas na bula, e estão de acordo com os obtidos pelos métodos de comparação, em nível de confiança de 95% onde os valores de t calculados (*test t-Student*) foram menores que o valor crítico teórico (2,40; N=3), confirmando que não há diferenças estatisticamente significativas entre os resultados. Os valores de recuperação do método indicam uma boa exatidão do método desenvolvido. (n = 3) e que não há efeito de matriz de forma significativa.

Conclusões parciais

O método CE-C⁴D proposto foi aplicado de forma bem sucedida para a determinação simultânea de ARG, ASC e ASP em amostras farmacêuticas. A estratégia apresentada descarta os possíveis interferentes e supera a limitação de outras técnicas analíticas na determinação de ARG, ASC e ASP em uma mesma corrida. O método proposto é rápido (menos de um minuto) e consome pequenos volumes de amostra e reagentes. Essas características tornam o procedimento uma alternativa viável e interessante para o controle de qualidade em formulações farmacêuticas comerciais. Ademais, a preparação das amostras é simples, contando apenas com dissolução e diluição em água.

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, procedimentos utilizando CE-C⁴D tiveram êxito para a determinação rápida e simultânea dos seguintes princípios ativos presentes em formulações farmacêuticas:

- Difenidramina e amônio;
- Arginina, ácido ascórbico e aspartato.

Os métodos apresentam características vantajosas como baixo custo de análise, equipamento e manutenção, alta frequência analítica (eletroferogramas obtidos em menos de um minuto), consumo mínimo de reagentes e amostras (pequeno impacto ambiental) e possibilidade de determinação simultânea de cátions e ânions.

Em relação à determinação rápida de DIP e NH₄⁺, a estratégia inédita proposta foi a utilização de um BGE composto por 30 mmol L⁻¹ de MES + 15 mmol L⁻¹ LiOH (pH = 6,0). Esta estratégia proporcionou, pela primeira vez, a possibilidade de determinação simultânea destes dois princípios ativos, não é encontrado nenhum método na literatura que possibilita a

análise simultânea desses analitos, nem através da técnica comumente usada para análise de fármacos, o HPLC. Além da análise simultânea de um composto orgânico e outro inorgânico, o método proposto possui vantagens sobre os métodos de referência em relação à frequência analítica e o consumo de reagentes e amostras. Apesar da detecção ser condutométrica, a quantidade de NaOH nas amostras não interferiu nas análises dos princípios ativos e proporcionou uma sensibilidade adequada às concentrações encontradas nas amostras.

O BGE composto por 20 mmol L⁻¹ de TAPS + 10 mmol L⁻¹ NaOH (pH = 8,7) demonstrou ser apropriado para a determinação simultânea, pela primeira vez, de ARG, ASC e ASP em medicamentos. Um método simples, rápido e com alta frequência analítica é proposto para a análise de cátions e ânions, em uma única injeção.

Em frente às desvantagens mais significativas da CE-C⁴D, sensibilidade e análise em matrizes complexas, a perspectiva futura para o doutorado seria o uso de métodos computacionais para a otimização da síntese de um polímero molecularmente impresso (MIP), altamente seletivo, e desenvolvimento de novos métodos utilizando CE-C⁴D para a determinação desses compostos extraídos por MIP's. O foco seria em fármacos e drogas de abuso.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Al Bratty, Visible Spectrophotometric determination of Chlorpheniramine maleate and Diphenhydramine hydrochloride in raw and dosage form using Potassium permanganate, *Orient. J. Chem.* 32 (2016) 885–894. <https://doi.org/10.13005/ojc/320214>.
- [2] R.P. Bhole, S.S. Shinde, S.S. Chitlange, B. Wankhede, A high-performance thin layer chromatography (HPTLC) method for simultaneous determination of diphenhydramine hydrochloride and naproxen sodium in tablets, *Anal. Chem. Insights.* 10 (2015) 47–51. <https://doi.org/10.4137/Aci.s31506>
- [3] P.R. Criado, R.F.J. Criado, C.W. Maruta, C. d'Apparecida Machado Filho, Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos, *An. Bras. Dermatol.* 85 (2010) 195–210. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000200010>
- [4] B. Bucur, M.C. Icardo, J.M. Calatayud, Spectrophotometric determination of ammonium by an rFIA assembly, *Rev. Roum. Chim.* 51 (2006) 101–108. http://revroum.lew.ro/wp-content/uploads/2006/RRC_2_2006/Art_02.pdf
- [5] M. Swain, chemicalize.org chemicalize.org by ChemAxon Ltd., *J. Chem. Inf. Model.* 52 (2012) 613–615. <https://doi.org/10.1021/ci300046g>
- [6] Y. Deng, R. Chen, T. Hu, J. Yao, J. Wang, Simultaneous Determination of Arginine and Citrulline in Gourd Fruits and Melons by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Food Anal. Methods.* 10 (2017) 1369–1376. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0694-0>
- [7] D.L. Röhlen, J. Pilas, M.J. Schöning, T. Selmer, Development of an Amperometric Biosensor Platform for the Combined Determination of l-Malic, Fumaric, and l-Aspartic Acid, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183 (2017) 566–581. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2578-1>
- [8] M. Marli, P. Vidal, IBGE | Agência de Notícias | Expectativa de vida do brasileiro sobe para 75,8 anos, (2017). <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/18469-expectativa-de-vida-do-brasileiro-sobe-para-75-8-anos.html> (accessed February 8, 2018).
- [9] ANFARMAG, Controle de Qualidade na Farmácia Magistral - Especificação de Matérias primas, Leitura Crítica Dos Certificados Análise. (2006). <http://www.anfarmag.com.br/home> (accessed April 24, 2018).

- [10] A. de O. Ferreira, Guia prático da farmácia magistral, 2nd ed., Pharmabooks, Juiz de Fora, 2002.
- [11] C.C. FERRAZ, M.L. de O. SILVA, M.M.D.C. VILA, R.V.M. de OLIVEIRA, S.S. FARINA, Avaliação do controle de qualidade em farmácias com manipulação, in: Rev. Estud. Univ., Sorocaba, 2008: p. 135–148.
- [12] E. Wang, L. Zhu, L. Ma, H. Patel, Optical sensors for sodium, potassium and ammonium ions based on lipophilic fluorescein anionic dye and neutral carriers, Anal. Chim. Acta. 357 (1997) 85–90.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00532-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00532-1)
- [13] H. Eskandari, M.R. Shariati, Dodecylbenzene sulfonate-coated magnetite nanoparticles as a new adsorbent for solid phase extraction-spectrophotometric determination of ultra trace amounts of ammonium in water samples, Anal. Chim. Acta. 704 (2011) 146–153.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.005>
- [14] M.I.G.S. Almeida, J.M. Estela, M.A. Segundo, V. Cerd, A membraneless gas-diffusion unit - Multisyringe flow injection spectrophotometric method for ammonium determination in untreated environmental samples, Talanta. 84 (2011) 1244–1252.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.052>
- [15] Y. Zhu, D. Yuan, Y. Huang, J. Ma, S. Feng, K. Lin, A modified method for on-line determination of trace ammonium in seawater with a long-path liquid waveguide capillary cell and spectrophotometric detection, Mar. Chem. 162 (2014) 114–121.
<https://doi.org/10.1016/j.marchem.2014.03.011>
- [16] I.I. Timofeeva, A. V. Bulatov, A.L. Moskvina, S.D. Kolev, A gas-diffusion flow injection method coupled with online solid-liquid extraction for the determination of ammonium in solid samples, Talanta. 142 (2015) 140–144.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.051>
- [17] N. Strömberg, S. Hulth, Ammonium selective fluorosensor based on the principles of coextraction, Anal. Chim. Acta. 443 (2001) 215–225. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01221-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01221-1)
- [18] N. Strömberg, S. Hulth, A fluorescence ratiometric detection scheme for ammonium ions based on the solvent sensitive dye MC 540, Sensors Actuators, B Chem. 90 (2003) 308–318.
[https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00053-4)
- [19] W. Qin, Z. Zhang, B. Li, Y. Peng, Chemiluminescence flow system for the determination of ammonium ion, Talanta. 48 (1999) 225–229. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00246-X)

- [20] F. Nie, N. Wang, J. Zheng, J. Zhang, An ultrasensitive post chemiluminescence reaction of ammonium in NBS-dichlorofluorescein system and its application, *Talanta*. 84 (2011) 1063–1067.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.005>
- [21] S. Meseguer-Lloret, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Selective determination of ammonium in water based on HPLC and chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*. 536 (2005) 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.12.073>
- [22] J.J.R. Rohwedder, C. Pasquini, G.O. Neto, L.C. de Faria, Differential conductimetry in flow injection. Determination of ammonia in Kjeldahl digests, *Analyst*. 116 (1991) 841.
<https://doi.org/10.1039/an9911600841>
- [23] C. Henríquez, B. Horstkotte, V. Cerdà, A highly reproducible solenoid micropump system for the analysis of total inorganic carbon and ammonium using gas-diffusion with conductimetric detection, *Talanta*. 118 (2014) 186–194.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.005>
- [24] A. Senillou, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, F. Griffe, A miniaturized ammonium sensor based on the integration of both ammonium and reference FETs in a single chip, *Mater. Sci. Eng. C*. 6 (1998) 59–63.
[https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(98\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(98)00037-X)
- [25] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, S. Alegret, E. Fàbregas, Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 67–75. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(98\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(98)00097-9)
- [26] W. Wróblewski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, NH₄⁺ sensitive chemically modified field effect transistors based on siloxane membranes for flow-cell applications, *Anal. Chim. Acta*. 401 (1999) 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00492-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00492-4)
- [27] L.Y. Heng, S. Alva, M. Ahmad, Ammonium ion sensor based on photocured and self-plasticising acrylic films for the analysis of sewage, *Sensors Actuators, B Chem.* 98 (2004) 160–165.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2003.09.032>
- [28] A. Calvo-López, O. Ymbern, M. Puyol, J.M. Casalta, J. Alonso-Chamarro, Potentiometric analytical microsystem based on the integration of a gas-diffusion step for on-line ammonium determination in water recycling processes in manned space missions, *Anal. Chim. Acta*. 874 (2015) 26–32.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.038>
- [29] A.K. Abass, J.P. Hart, D.C. Cowell, A. Chappell, Development of an amperometric assay

- for NH_4^+ based on a chemically modified screen-printed NADH sensor, *Anal. Chim. Acta.* 373 (1998) 1–8.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00368-7)
- [30] A. Walcarius, V. Vromman, J. Bessiere, Flow injection indirect amperometric detection of ammonium ions using a clinoptilolite-modified electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* 56 (1999) 136–143.
[https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(99\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00181-1)
- [31] H. Sen Twu, T.R. Ling, T.C. Chou, M.C. Yang, Ultrasonic irradiation effect in the impregnation-reduction process of preparing Pt/Nafion NH_4^+ sensor, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 41–47.
[https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00026-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00026-2)
- [32] R.C.H. Kwan, P.Y.T. Hon, R. Renneberg, Amperometric determination of ammonium with bienzyme/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based biosensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 107 (2005) 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.11.028>
- [33] Y.C. Luo, J.S. Do, Amperometric ammonium ion sensor based on polyaniline-poly(styrene sulfonate-co-maleic acid) composite conducting polymeric electrode, *Sensors Actuators, B Chem.* 115 (2006) 102–108.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.027>
- [34] L.L. Tan, A. Musa, Y.H. Lee, Determination of ammonium ion using a reagentless amperometric biosensor based on immobilized alanine dehydrogenase, *Sensors.* 11 (2011) 9344–9360. <https://doi.org/10.3390/s111009344>
- [35] B. Preeyanut, P. Sarawut, Saichol Pimmongkol, Gamolwan Tumcharern, Albana Veseli, M. Eda, K. Kurt, S. Anchalee, A biosensor for the determination of ammonium ion using flow injection amperometric system, *Monatsh Chem.* 148 (2017) 635–644.
<https://doi.org/10.1007/s00706-016-1871-y>
- [36] R. Liu, B. Sun, D. Liu, A. Sun, Flow injection gas-diffusion amperometric determination of trace amounts of ammonium ions with a cupric hexacyanoferrate, *Talanta.* 43 (1996) 1049–1054.
[https://doi.org/10.1016/0039-9140\(96\)01858-9](https://doi.org/10.1016/0039-9140(96)01858-9)
- [37] P. Bertocchi, D. Compagnone, G. Palleschi, Amperometric ammonium ion and urea determination with enzymebased probes, *Biosens. Bioelectron.* 11 (1996) 1–10.
[https://doi.org/10.1016/0956-5663\(96\)83708-0](https://doi.org/10.1016/0956-5663(96)83708-0)
- [38] Anvisa, *Farmacopeia Brasileira*, 4^o edição Parte 1, Farm. Bras. (1998). http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260232/4_edicao_part1.pdf/26bb8af0-4c69-4a4f-ae2b-2a40fdc6ffe7 (accessed May 1, 2018).
- [39] Z. K. Ge, Simultaneous determination of ibuprofen and diphenhydramine HCl in orally

- disintegrating tablets and its dissolution by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), *African J. Pharm. Pharmacol.* 5 (2011) 2100–2105.
<https://doi.org/10.5897/AJPP11.582>
- [40] C. Wang, G. Fan, M. Lin, Y. Chen, W. Zhao, Y. Wu, Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of d-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma and its application to a pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B.* 854 (2007) 48–56.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.038>
- [41] M.S. Ali, M. Ghori, S. Rafiuddin, A.R. Khatri, A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for the simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough-cold formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.06.038>
- [42] C. Barbas, a García, L. Saavedra, M. Castro, Optimization and validation of a method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography. Stress test for stability evaluation., *J. Chromatogr. A.* 870 (2000) 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01186-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01186-3)
- [43] H.-P. Yuan, D.C. Locke, High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Diphenhydramine in Liquid and Solid Drug Dosage Forms and Its Application to Stability Testing, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17 (1991) 2319–2331.
<https://doi.org/10.3109/03639049109048077>
- [44] K. Selinger, J. Prevost, H.M. Hill, High-performance liquid chromatography method for the determination of diphenhydramine in human plasma, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 526 (1990) 597–602.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82546-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82546-3)
- [45] S.B. Mahato, N.P. Sahu, S.K. Maitra, Simultaneous determination of chlorpheniramine and diphenhydramine in cough syrups by reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 351 (1986) 580–584.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)83542-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)83542-1)
- [46] D.R. Abernethy, D.J. Greenblatt, Diphenhydramine Determination in Human Plasma by Gas–Liquid Chromatography using Nitrogen–Phosphorus Detection: Application to Single Low-Dose Pharmacokinetic Studies, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 941–943.
<https://doi.org/10.1002/jps.2600720825>
- [47] W. Bilzer, U. Gundert-Remy, Determination of nanogram quantities of diphenhydramine and orphenadrine in human plasma using gas-liquid chromatography, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 6 (1973) 268–270. <https://doi.org/10.1007/BF00644744>
- [48] M.M.A.C. Ribeiro, J.M. Freitas, R.A.A. Muñoz, C.L. do Lago, E.M. Richter, Fast

- determination of diphenhydramine, pyridoxine, and 8-chlorotheophylline by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Anal. Methods*. 8 (2016) 4432–4437.
<https://doi.org/10.1039/C6AY00943C>
- [49] Y. Dong, X. Chen, Y. Chen, X. Chen, Z. Hu, Separation and determination of pseudoephedrine, dextromethorphan, diphenhydramine and chlorpheniramine in cold medicines by nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 285–289.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.032>
- [50] J. Liu, W. Cao, X. Yang, E. Wang, Determination of diphenhydramine by capillary electrophoresis with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) electrochemiluminescence detection, *Talanta*. 59 (2003) 453–459. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00535-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00535-0)
- [51] A.F. Marchesini, M.R. Williner, V.E. Mantovani, J.C. Robles, H.C. Goicoechea, Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 39–46.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00600-3](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00600-3)
- [52] M.R. Gomez, R.A. Olsina, L.D. Martínez, M.F. Silva, Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramine and phenylephrine in expectorant and decongestant syrups by capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 791–799.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00362-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00362-X)
- [53] Anvisa, Farmacopeia Brasileira, 5^o, Brasília, 2010. http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf (accessed May 2, 2018).
- [54] F.A.. Matias, M. Vila, M. Tubino, Quantitative reflectance spot test for the determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations, *J. Braz. Chem. Soc.* 2 (2004) 327–330.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000200027>
- [55] U.S. Pharmacopeia, USP Monographs: Arginine Hydrochloride, (n.d.). http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m5850.html (accessed May 2, 2018).
- [56] W.Z. Zhang, D.M. Kaye, Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled orthophthalaldehyde precolumn derivatization, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 87–92.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.11.006>
- [57] T. Teerlink, R.J. Nijveldt, S. De Jong, P.A.M. Van Leeuwen, Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and

- other biological samples by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 303 (2002) 131–137. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5575>
- [58] M. Rigobello-Masini, J.C.P. Penteado, C.W. Liria, M.T.M. Miranda, J.C. Masini, Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography for fluorimetric determination of intracellular free amino acids in the microalgae *Tetraselmis gracilis*, *Anal. Chim. Acta.* 628 (2008) 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.030>
- [59] M. Suzuki, M. Furuhashi, S. Sesoko, K. Kosuge, T. Maeda, K. Todoroki, K. Inoue, J.Z. Min, T. Toyo’oka, Determination of creatinine-related molecules in saliva by reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry and the evaluation of hemodialysis in chronic kidney disease patients, *Anal. Chim. Acta.* 911 (2016) 92–99. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2016.01.032>
- [60] H.-Y. Wang, P. Hu, J. Jiang, Rapid Determination of Underivatized Arginine, Ornithine, Citrulline and Symmetric/Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma by LC–MS, *Chromatographia.* 71 (2010) 933–939. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1535-8>
- [61] J.H. Baxter, P.W. Johns, Determination of Free Arginine, Glutamine, and β -alanine in Nutritional Products and Dietary Supplements, *Food Anal. Methods.* 5 (2012) 821–827. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9318-x>
- [62] H. ming Mao, W. Wei, W. jun Xiong, Y. Lu, B. guan Chen, Z. Liu, Simultaneous determination of l-citrulline and l-arginine in plasma by high performance liquid chromatography, *Clin. Biochem.* 43 (2010) 1141–1147. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.05.017>
- [63] Y. Zhu, Y. Luo, P. Wang, M. Zhao, L. Li, X. Hu, F. Chen, Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation, *Food Chem.* 194 (2015) 643–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.054>
- [64] A.L. Huidobro, F.J. Rupérez, C. Barbas, Tandem column for the simultaneous determination of arginine, ibuprofen and related impurities by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1119 (2006) 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.090>
- [65] E. V. Narezhnaya, O.I. Askalepova, A.A. Nikashina, I.I. Krukier, T.N. Pogorelova, Determination of L-arginine in amniotic fluid by capillary zone electrophoresis, *J. Anal. Chem.* 65 (2010) 1280–1283. <https://doi.org/10.1134/S1061934810120130>
- [66] M. Forteschi, S. Sotgia, G. Pintus, A. Zinellu, C. Carru, Simultaneous determination of citrulline and arginine in human blood plasma by capillary electrophoresis with ultraviolet absorption detection, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2418–2423. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400177>
- [67] E. Hanff, A.A. Kayacelebi, G.R. Yanchev, N. Maassen, A. Haghighia, D. Tsikas,

- Simultaneous stable-isotope dilution GC–MS measurement of homoarginine, guanidinoacetate and their common precursor arginine in plasma and their interrelationships in healthy and diseased humans, *Amino Acids*. 48 (2016) 721–732.
<https://doi.org/10.1007/s00726-015-2120-0>
- [68] A.A. Kayacelebi, A.-K. Knöfel, B. Beckmann, E. Hanff, G. Warnecke, D. Tsikas, Measurement of unlabeled and stable isotope-labeled homoarginine, arginine and their metabolites in biological samples by GC–MS and GC–MS/MS, *Amino Acids*. 47 (2015) 2023–2034.
<https://doi.org/10.1007/s00726-015-1984-3>
- [69] M. Sekine, H. Fukuda, N. Nimura, T. Furuchi, H. Homma, Automated column-switching high-performance liquid chromatography system for quantifying N-methyl-D- and -L-aspartate, *Anal. Biochem.* 310 (2002) 114–121. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00315-9)
- [70] K. Shibata, N. Sugaya, W. Ono, K. Abe, S. Takahashi, Y. Kera, Determination of d-aspartate N-methyltransferase activity in the starfish by direct analysis of N-methyl-d-aspartate with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 3229–3234.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.02.035>
- [71] A. D’Aniello, A. De Simone, P. Spinelli, S. D’Aniello, M. Branno, F. Aniello, J. Rios, M. Tsesarskaja, G. Fisher, A specific enzymatic high-performance liquid chromatography method to determine N-methyl-D-aspartic acid in biological tissues, *Anal. Biochem.* 308 (2002) 42–51. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00326-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00326-3)
- [72] J.E. Thompson, T.W. Vickroy, R.T. Kennedy, Rapid determination of aspartate enantiomers in tissue samples by microdialysis coupled on-line with capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2379–2384. <https://doi.org/10.1021/ac981115c>
- [73] H.L. Chen, X.J. Zhang, S. Da Qi, H.X. Xu, J.J.Y. Sung, Z.X. Bian, Simultaneous determination of glutamate and aspartate in rat periaqueductal gray matter microdialysates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 3248–3252.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.08.006>
- [74] U.S. Pharmacopeia, USP Monographs: Aspartic Acid, (n.d.).
http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m6198.html (accessed May 2, 2018).
- [75] C. Hasselmann, P.A. Diop, DETERMINATION OF L-ASCORBIC-ACID IN FOODS - A REVIEW (1976-1981)., *Sci. Des Aliment.* 2 (1983) 161–180.
- [76] J.P. Barthelemy, Determination of L-ascorbic acid by high-performance liquid chromatography. A review (1986-1992), *Analisis.* 4 (1996) 95–103.

- [77] M.C. Yebra-Biurrun, Flow injection determination methods of ascorbic acid. *Talanta*, 2000. 52(3): p. 367-383., *Talanta*. 3 (2000) 367–383. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00402-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00402-1)
- [78] 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>
- [79] L. Novakova, P. Solich, D. Solichova, HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Trac-Trends Anal. Chem.* 10 (2008) 942–958.
- [80] A.M. Pisoschi, Electrochemical methods for ascorbic acid determination, *Electrochim. Acta.* 121 (2014) 443–460.
- [81] 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>
- [82] M.F.M. Tavares, Mecanismos de separação em eletroforese capilar, *Quim. Nova.* 20 (1997) 493–511. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000500010>
- [83] I.J. Colton, J.D. Carbeck, J. Rao, G.M. Whitesides, Affinity capillary electrophoresis: A physical-organic tool for studying interactions in biomolecular recognition, *Electrophoresis.* 19 (1998) 367–382. <https://doi.org/10.1002/elps.1150190303>
- [84] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111–113. <https://doi.org/10.1021/ac00265a031>
- [85] D.A. Spudeit, M.D. Dolzan, G.A. Micke, Conceitos básicos em eletroforese capilar, *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 287–297. <https://doi.org/10.4322/sc.2012.017>
- [86] A. Tiselius, The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins., Suécia, 1930.
- [87] M.F.M. Tavares, Eletroforese capilar: Conceitos básicos, *Quim. Nova.* 19 (1995) 173–181. <https://doi.org/10.1002/mas>
- [88] S. Hjertén, FREE ZONE ELECTROPHORESIS, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967).
- [89] M.C. Marra, Aplicação da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo aspirina ou dipirona em combinação com outros princípios ativos, Uberlândia, 2014.
- [90] Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M, Verheggen, P.E.M., Concentration distributions in free zone electrophoresis., *J. Chromatogr.* 169 (1979) 1–10. <https://doi.org/10.1016/0021->

[9673\(75\)85028-X](#)

- [91] P.G. Riches, J. Kohn, Improved resolution of cellulose acetate membrane electrophoresis, *Ann. Clin. Biochem.* 24 (1987) 77–79. <https://doi.org/10.1177/000456328702400112>
- [92] 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>
- [93] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Capillary zone electrophoresis, *Sci. (Washington, DC);(United States)*. 222 (1983).
- [94] H.H. Lauer, D. McManigill, Capillary Zone Electrophoresis of Proteins in Untreated Fused Silica Tubing, *Anal. Chem.* 58 (1986) 166–170. <https://doi.org/10.1021/ac00292a041>
- [95] J.H. Knox, I.H. Grant, Miniaturisation in pressure and electroosmotically driven liquid chromatography: Some theoretical considerations, *Chromatographia*. 24 (1987) 135–143. <https://doi.org/10.1007/BF02688476>
- [96] J.H. Knox, I.H. Grant, Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50 μm silica gels and ODS bonded silica gels, *Chromatographia*. 32 (1991) 317–328. <https://doi.org/10.1007/BF02321428>
- [97] W.J. Böckel, E.M.A. Martini, D. Samios, C.M.S. Piatnicki, Um equipamento de eletroforese capilar com detecção condutométrica construído em laboratório, *Quim. Nova*. 28 (2005) 1106–1110. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600027>
- [98] L.M. de Carvalho, C. Splenger, A.P.S. de Lima, A. Raabe, Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório, *Quim. Nova*. 32 (2009) 2203–2208. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000800018>
- [99] K. Fraige, N.A. Assunção, R. de Souza Pinto, E. Carrilho, Analytical Assessment of a Home Made Capillary Electrophoresis Equipment with Linear Charge Coupled Device for Visible Light Absorption Detection in the Determination of Food Dyes, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 1862–1878. <https://doi.org/10.1080/10826070903091571>
- [100] J.A. Fracassi Da Silva, Detecção eletroquímica em eletroforese capilar, *Quim. Nova*. 26 (2003) 56–64. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100012>
- [101] P.F. Gavin, A.G. Ewing, Characterization of Electrochemical Array Detection for Continuous Channel Electrophoretic Separations in Micrometer and Submicrometer Channels, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3838–3845. <https://doi.org/10.1021/ac9702554>
- [102] A.T. Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, Capillary Electrophoresis Chips with

- Integrated Electrochemical Detection, *Anal. Chem.* 70 (1998) 684–688. <https://doi.org/10.1021/ac971135z>
- [103] W.K.T. Coltro, Fabricação e avaliação de Microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica, (2004).
- [104] L. Blanes, Inovações Instrumentais em Sistemas de Eletroforese Capilar com Detecção Eletroquímica e Aplicações em Análises de Mono e Oligossacarídeos, Aminoácidos e Proteínas, Universidade de São Paulo, 2008.
- [105] K.J.M. Francisco, Implementação e Otimização de Detector Condutométrico sem Contato para Eletroforese Capilar, Universidade de São Paulo, 2010.
- [106] S. Ahuja, M.I. Jimidar, Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, *Capill. Electrophor. Methods Pharm. Anal.* 9 (2008) 145–169. [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(07\)00001-3](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(07)00001-3)
- [107] M.N. El-Attug, E. Adams, A. van Schepdael, Development and validation of a capillary electrophoresis method with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C4D) for the analysis of amikacin and its related substances, *Electrophoresis*. 33 (2012) 2777–2782. <https://doi.org/10.1002/elps.201100688>
- [108] L.P. Lourenço, F.A. Aguiar, A.R.M. De Oliveira, C.M. De Gaitani, Quantitative determination of lercanidipine enantiomers in commercial formulations by capillary electrophoresis, *J. Anal. Methods Chem.* 2015 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/294270>
- [109] M.A.L. De Oliveira, B.L.S. Porto, I.D.L. Faria, P.L. De Oliveira, P.M. De Castro Barra, R. De Jesus Coelho Castro, R.T. Sato, 20 Years of Fatty Acid Analysis By Capillary Electrophoresis, *Molecules*. 19 (2014) 14094–14113. <https://doi.org/10.3390/molecules190914094>
- [110] 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>
- [111] R.R. Cunha, Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecçãocondutométrica sem contato (CE-C4D)., Uberlândia, 2013.
- [112] D.C. HARRIS, Análise Química Quantitativa, 2008.
- [113] R. Weinberger, Practical Capillary Electrophoresis Academic Press, Boston, 1993.
- [114] C.H. Collins, Fundamentos de cromatografia, 2^a, 2006.
- [115] H.T.G. Carolina Schaper Bizzotto, Adriana Dillenburg Meinhart, Cristiano Augusto

- Ballus, Gislaine Ghiselli, Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee, *Food Science Technol.* 33 (2013) 186–191. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000013>
- [116] D.N. HEIGER, High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett Packard Co. (1997) 5091–6199.
- [117] 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>
- [118] D.W. FUERSTENAU, Streaming Potential Studies on Quartz in Solutions of Aminium Acetates in Relation to the Formation of Hemi- micelles at the Quartz-Solution Interface. *Journal of physical chemistry, J. Phys. Chem.* 60 (1956) 981–985. <https://doi.org/10.1021/j150541a039>
- [119] M.M.A. de C. Ribeiro, Desenvolvimento de métodos rápidos de análise de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)., UBERLÂNDIA, 2017.
- [120] R.R. Cunha, Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de paracetamol na presença de outros princípios ativos em formulações farmacêuticas por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D), Universidade Federal de Uberlândia Instituto, 2017.
- [121] B. Gas, C. Sanger, P. Muijselaar, High performance capillary electrophoresis., 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016148>
- [122] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principies of Instrumental Analysis*, 5^a, 1998.
- [123] A.J. Zemann, Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 24 (2003) 2125–2137. <https://doi.org/10.1002/elps.200305476>
- [124] R. et al. NEHMÉ, 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>
- [125] P.P. Vázquez, A.R. Mughari, M.M. Galera, Application of solid-phase microextraction for determination of pyrethroids in groundwater using liquid chromatography with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1188 (2008) 61–68. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2008.02.030>
- [126] A.R. Mughari, P.P. Vázquez, M.M. Galera, Analysis of phenylurea and propanil herbicides by solid-phase microextraction and liquid chromatography combined with

- post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta.* 593 (2007) 157–163. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2007.04.061>
- [127] P.P. Vázquez, A.R. Mughari, M.M. Galera, Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta.* 607 (2008) 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.027>
- [128] I. Azumaya, H. Kagechika, Y. Fujiwara, M. Itoh, K. Yamaguchi, K. Shudo, Twisted intramolecular charge-transfer fluorescence of aromatic amides: conformation of the amide bonds in excited states, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 2833–2838. <https://doi.org/10.1021/ja00008a005>
- [129] V. Rodwell, D. Bender, *Bioquímica Ilustrada de Harper*, 30^a, AMGH, 2017.
- [130] 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>
- [131] D.C. Chen, S.S. Chang, C.H. Chen, Parallel-opposed dual-electrode detector with recycling amperometric enhancement for capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3200–3205. <https://doi.org/10.1021/ac990069t>
- [132] R.A. Wallingford, A.G. Ewing, Amperometric detection of catechols in capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions, *Anal. Chem.* 60 (1988) 258–263. <https://doi.org/10.1021/ac00154a015>
- [133] W. Jin, Q. Xu, W. Li, Determination of clozapine by capillary zone electrophoresis following end-column amperometric detection with simplified capillary/electrode alignment, *Electrophoresis.* 21 (2000) 1415–1420. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1415::AID-ELPS1415>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1415::AID-ELPS1415>3.0.CO;2-M)
- [134] M. van Bruijnsvoort, S.K. Sanghi, H. Poppe, W.T. Kok, Determination of chlorophenols by micellar electrokinetic chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A.* 757 (1997) 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00673-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00673-5)
- [135] F.M. Lanças, A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”?, *Sci. Chromatogr.* 5 (2009) 27–46. <https://doi.org/10.4322/sc.2013.005>
- [136] C. van der, F.M. Evraerts, T.P.E.M. Verheggen, J.A. Poullis, A.c. conductivity measurements in isotachopheresis, *Anal. Chim. Acta.* 59 (1972) 298–301. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)95095-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)95095-0)
- [137] M. DEML, F. FORET, P. BOCEK, Electric sample splitter for capillary zone

- electrophoresis, *J. Chromatogr.* 320 (1985) 159–165.
- [138] 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)
- [139] A.J. Zemmann, 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>
- [140] J. a F. Da Silva, C.L. Do Lago, An oscillometric detector for capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4339–4343. <https://doi.org/10.1021/ac980185g>
- [141] 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>
- [142] 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>
- [143] 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>
- [144] 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>
- [145] M.M.A.C. Ribeiro, J.M. Freitas, R.A.A. Muñoz, C.L. Do Lago, E.M. Richter, Fast determination of diphenhydramine, pyridoxine, and 8-chlorotheophylline by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection, *Anal. Methods.* 8 (2016) 4432–4437. <https://doi.org/10.1039/c6ay00943c>
- [146] D.T. Gimenes, R.R. Cunha, M.M.A. de 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>
- [147] 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. Acta.* 673 (2010) 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.031>
- [148] M.A.L. Oliveira, C.L. Do Lago, M.F.M. Tavares, J.A. Fracassi Da Silva, Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar utilizando detecção condutométrica sem contato, *Quim. Nova.* 26 (2003) 821–824. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600007>

- [149] P. Kubán, P. Kubán, V. Kubán, Simultaneous determination of inorganic and organic anions, alkali, alkaline earth and transition metal cations by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection., *Electrophoresis*. 23 (2002) 3725–3734. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200211\)23:21<3725::AID-ELPS3725>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200211)23:21<3725::AID-ELPS3725>3.0.CO;2-9)
- [150] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology Gold Book, 2014. <https://doi.org/10.1351/goldbook.I03352>
- [151] G.P. Carr, J.C. Wahlich, A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (1990) 613–618. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(90\)80090-C](https://doi.org/10.1016/0731-7085(90)80090-C)
- [152] 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.
- [153] G.M. Lawson, Defining limit of detection and limit of quantitation as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus, *Clin. Chem.* 40 (1994) 1218–1219.
- [154] A.F. Attili, D. Autizi, L. Capocaccia, S. Costantini, F. Cotta-Ramusino, Rapid determination of plasma ammonia using an ion specific electrode, *Biochem. Med.* 14 (1975) 109–116. [https://doi.org/10.1016/0006-2944\(75\)90025-3](https://doi.org/10.1016/0006-2944(75)90025-3)
- [155] M. Jaroš, T. Soga, T. van de Goor, B. Gaš, Conductivity detection in capillary zone electrophoresis: Inspection by PeakMaster, *Electrophoresis*. 26 (2005) 1948–1953. <https://doi.org/10.1002/elps.200410366>