

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

RAYSSA BORGES RESENDE

Determinação simultânea de hidroclorotiazida e metoprolol por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues Batista

UBERLÂNDIA - MG
Outubro, 2019

RAYSSA BORGES RESENDE

Determinação simultânea de hidroclorotiazida e metoprolol por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D)

Trabalho de Conclusão de
Curso de Química Industrial da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do título de Bacharel
em Química.

Orientador: Prof. Dr. Alex Domingues Batista

Co-orientadora: Ms. Michelle Miranda Araújo de Carvalho Ribeiro

UBERLÂNDIA - MG

Outubro, 2019

RAYSSA BORGES RESENDE

Determinação simultânea de hidroclorotiazida e metoprolol por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D)

Trabalho de Conclusão de Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovado em: 25 / 10 / 2019 Nota: 85

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alex Domingues Batista (Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Assinatura: Alex Domingues Batista

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz (Membro)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Assinatura: Rodrigo

Thiago da Costa Oliveira (Membro)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Assinatura: Thiago da Costa Oliveira

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeira mão à Deus por me manter focada nesses anos e me permitir concluir o curso.

Agradeço, em especial, meus pais, Alex e Denise, e meu irmão, Rudgery, que em todos esses anos de luta estiveram ao meu lado me dando força e sempre acreditando no meu potencial.

Agradeço aos amigos feito durante a faculdade, Felipe, João, Raquel, Larissa, Malu, Bruno e Higor que estiveram comigo em todos os momentos, e tornaram menos árdua a caminhada até a conclusão do curso.

Agradeço aos professores do Instituto de Química que contribuíram com a minha formação através de todo o conhecimento repassado. Em especial ao Professor Dr. Alex Domingues Batista que me deu a oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço a Michelle que me acompanhou em todas as análises e compartilhou comigo seus conhecimentos.

RESUMO

Neste trabalho foi utilizada a técnica de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D) para desenvolver um método rápido de controle de qualidade de hidroclorotiazida (HCT) e metoprolol (MET) em formulações farmacêuticas. Para a determinação simultânea foi utilizado um tampão de corrida (BGE) de H₃BO₃ 10 mmol/L ajustado com NaOH para pH = 9,0, com tempo de análise inferior a 80 segundos. Os limites de detecção (LOD) foram 30 e 65 µmol/L para a HCT e MET, respectivamente. As curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,993 e DPR menores de 5 % (n = 10). O método se apresentou exato com valores de recuperação de 95% e 102% para HCT e MET, respectivamente. Além disso, o método CE-C⁴D desenvolvido é simples, gera quantidades mínimas de resíduos (menor impacto ambiental), é de baixo custo (equipamento e manutenção) e possui elevada frequência analítica: 34 injeções h⁻¹.

Palavras chave: Determinação simultânea. Amostras Farmacêuticas. Controle de qualidade. Princípios ativos. Hidroclorotiazida. Metoprolol. CE-C⁴D

ABSTRACT

In this work, capillary electrophoresis with contactless capacitive coupled conductivity detection technique (CE-C⁴D) was used for the development of a fast method of quality control of hydrochlorothiazide (HCT) e metoprolol (MET) pharmaceutical formulations. For simultaneous determination, the buffer (BGE) was composed by 10 mmol/L of H₃BO₃ adjusted with NaOH to pH = 9,0, with analysis time less than 80 seconds. The limits of detection (LOD) were 30 and 65 µmol/L for HCT and MET, respectively. Calibration curves showed correlation coefficients greater than 0,993 and RSD values less than 5% (n=10). The method presented recovery values of 95% and 102% for HCT and MET, respectively. 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: 34 injections h⁻¹.

Palavras chave: Simultaneous determination. Pharmaceutical samples. Quality control. Active ingredients. Hydrochlorothiazide. Metoprolol. CE-C⁴D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da formação da dupla camada elétrica.....	17
Figura 2 – Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.....	18
Figura 3 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.....	19
Figura 4 – Perfil de fluxo gerado pelo EOF (a) e fluxo gerado por pressão (b), e suas correspondentes zonas de amostras.....	20
Figura 5 – Esquema do sistema de detecção C ⁴ D e representação de um eletroferograma. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.....	23
Figura 6 – Diagrama de distribuição das espécies vs pH para a hidroclorotiazida (HCT) e suas respectivas espécies.....	26
Figura 7 – Diagrama de distribuição das espécies vs pH para metoprolol (MET) e suas respectivas espécies.....	27
Figura 8 – Equipamento de CE-C ⁴ D utilizado na realização dos experimentos (a) e esquema do sistema (b).....	31
Figura 9 – Estruturas e valores de pKa para hidroclorotiazida (HCT) e metoprolol (MET).....	32

Figura 10 – Eletroferogramas de uma solução padrão composta por 100 µmol/L de HCT e 175 µmol/L de MET, BGE's: (i) 20 mmol/L de H₃BO₃ com 5 mmol/L, (ii) 20 mmol/L de CHES com 6 mmol/L de NaOH e (iii) 20 mmol/L de TRIS/TAPS como 5 mmol/L de NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal..... 33

Figura 11 – Eletroferogramas da composição do BGE utilizando uma solução padrão de 100 µmol/L HCT e 175 µmol/L MET. BGE: 10, 20 e 30 mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH em pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal..... 34

Figura 12 – Eletroferogramas do efeito da variação de pH na separação de HCT e MET, utilizando uma solução padrão de 100 µmol/L de HCT e 175 µmol/L de MET. BGE: ácido bórico 10 mmol/L ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal..... 35

Figura 13 – Eletrofereogramas do tempo de injeção da solução padrão de MET e HCT, utilizando uma solução padrão de 300 µmol/L de HCT e 900 µmol/L de MET. BGE: 10 mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH em pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 s a 2,5 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção) EOF: normal..... 36

Figura 14 – Eletroferogramas do estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas utilizando uma solução padrão de 300 µmol/L de HCT e 900 µmol/L de MET. BGE: 10 mmol/L de ácido bórico ajustado com hidróxido de sódio para um pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal..... 37

Figura 15 – Eletroferograma obtido a partir da injeção de soluções padrão de MET e HCT e suas respectivas curvas analíticas. Concentrações crescentes: (a-e: 100 – 500 $\mu\text{mol/L}$) de MET e (a-e: 200 – 1000 $\mu\text{mol/L}$) de HCT. BGE: 10mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH em pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal..... 38

Figura 16 – Eletroferogramas obtido com injeção de uma solução padrão e amostra de 900 $\mu\text{mol/L}$ de MET e 300 $\mu\text{mol/L}$ de HCT. BGE: 10 mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH para pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Faixa de limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.....	22
Tabela 2 – Relação de reagentes e empresas onde foram adquiridos.....	30
Tabela 3 – Parâmetros analíticos do método proposto.....	38
Tabela 4 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de MET e HCT via CE-C ⁴ D.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGE	Eletrólito de corrida (do inglês, “ <i>Background electrolyte</i> ”)
C ⁴ D	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (do inglês, “ <i>Contactless Capacitive Coupled Conductivity Detection</i> ”) ou detecção condutométrica sem contato
CE	Eletroforese Capilar (do inglês, “ <i>Capillary Electrophoresis</i> ”)
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico
CZE	Eletroforese capilar de zona (do inglês “ <i>Capillary zone electrophoresis</i> ”)
EOF	Fluxo eletrosmótico (do inglês “ <i>Electroosmotic flow</i> ”)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês “ <i>Gas chromatography</i> ”)
HCT	Hidroclorotiazida
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “ <i>High performance liquid chromatography</i> ”)
LOD	Limite de detecção (do inglês “ <i>Limit of detection</i> ”)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês “ <i>Limit of quantification</i> ”)
TAPS	3[[2-Hidroxi-1,1bis (hidroximetil)etil] amino]-1- propanossulfônico
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-1,3-diol

UEF

Mobilidade Efetiva

LISTA DE EQUAÇÕES

$$\mu_{ef} = \sum \mu_j \alpha_j \quad (1)$$

$$v_{ef} = \mu_{ef} \times E \quad (2)$$

$$t_m = \frac{lL}{E(\mu_{ep} + \mu_{eo})} \quad (3)$$

$$RS = \frac{2(t_{mi} - t_{mi+1})}{(w_i + w_{wi+1})} \quad (4)$$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
	1.1 Breve histórico	15
	1.2 Abordagem teórica	16
	1.2.1 O conceito de mobilidade efetiva	16
	1.2.2 Fluxo eletrosmótico (EOF) e sua importância em CE	17
	1.3 Eletroforese capilar de zona (CZE)	21
	1.4 Determinação simultânea de cátions e ânions	22
	1.5 Sistemas de detecção em CE	22
	1.6 Detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C^4D)	23
	1.7 Análises rápidas por CE	25
	1.8 Espécies estudadas	25
	1.8.1 Hidroclorotiazida	26
	1.8.2 Metoprolol	27
	1.9 Formulações farmacêuticas	28
2	OBJETIVOS	29
3	PARTE EXPERIMENTAL	30
	3.1 Reagentes e amostras	30
	3.2 Instrumentação	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico da Eletroforese Capilar

Há várias décadas, notou-se que uma diferença na velocidade de migração entre diferentes substâncias poderia ser utilizada na separação e quantificação das mesmas. A técnica de separação em questão é denominada eletroforese, em que há migração de moléculas ou espécies carregadas quando submetidas a um campo elétrico (HEIGER, 1997). Arne Wilhelm Karsin Tiselius foi o responsável pelo desenvolvimento de tal método de separação. Por meio de seu estudo com a separação de proteínas no soro sanguíneo a partir da diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em um eletrólito, através do qual tinha sido aplicado um campo elétrico (TISELIUS, 1930).

A eletroforese capilar (CE) possuía uma limitação nos experimentos que era a falta de habilidade para dissipar o calor (Efeito Joule), tendo como consequência o aquecimento da solução, que acentua de forma comprometedora a difusão das espécies. O calor é dissipado somente pelas extremidades do recipiente causando convecção (TAVARES, 1996). Sendo assim, em 1960, Hjerten introduziu a eletroforese em tubos capilares, com o emprego de um tubo de quartzo de 0,3 mm e voltagens que variavam entre 2,5 – 3,0 kV, afim de minimizar os efeitos indesejáveis do Efeito Joule. Hjerten, em 1983, também contribuiu muito para a área com um trabalho onde adaptou a eletroforese em gel para os tubos capilares, porém, os problemas de eficiência foram mantidos (HJERTEN, 1983)

Na década de 80, a história da eletroforese teve um grande avanço com os trabalhos de Jorgenson e Lukacs (JORGENSON; LUKACS, 1981; JORGENSON; LUKACS, 1983) que utilizaram pela primeira vez, capilares de sílica fundida com diâmetro interno extremamente pequenos, cerca de 75 micrometros. Com essa redução do diâmetro interno do capilar, o indesejado efeito Joule praticamente deixou de existir. Isso porque a redução do diâmetro interno do capilar fez com que a relação entre a área superficial interna e o volume da solução aumentasse, favorecendo a dissipação de calor e permitindo a aplicação de campos elétricos mais elevados. Desta forma foi possível diminuir os tempos de análises e gerou maior eficiência de separação.

Nos últimos anos, a CE vem sendo utilizada como uma importante técnica alternativa a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a separação e análise de compostos de interesse industrial, farmacêutico, clínico e ambiental (KUBAN; HAUSER, 2008). A CE vem tomando lugar devido aos fatores que são vistos como atrativos pela comunidade científica, como (CUNHA, 2013):

- Rapidez nas análises;
- Versatilidade, uma vez que uma única coluna capilar pode ser utilizada para a separação de compostos completamente diferentes, sendo necessária apenas a mudança da solução tampão;
- Baixo custo, não só do equipamento como também da manutenção, devido à utilização de pequenos volumes de reagentes e amostras quando comparado com a HPLC.

Entretanto, a CE também possui algumas limitações, como:

- Dependência do valor de pH do BGE: necessita de um tampão estável (CUNHA 2013);
- Compostos voláteis, não polares e de massa molar baixa não se adequam com a técnica da CE, sendo melhores analisados por GC;
- Não adequada para polímeros não iônicos de massa molar alta por não ser tão sensível quando o HPLC, que determina espécies em níveis de traços (QUEIROZ; JARDIM, 2001).

1.2 Abordagem teórica

A seguir serão discutidos fundamentos teóricos aplicados à eletroforese capilar de zona (CZE), praticada em capilares de sílica fundida (RIBEIRO, 2017), que é utilizado neste trabalho.

1.2.1 O conceito de mobilidade efetiva

O conceito de mobilidade efetiva é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. A mobilidade efetiva (u_{ef}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius, em que qualquer substância (i) presente em solução em formas diferentes (j) e relacionadas entre si por um equilíbrio ácido-base rápido, irá migrar em um campo

elétrico como um soluto único, possuindo uma certa mobilidade efetiva, onde α é a fração molar e μ_j a mobilidade iônica individual j (TAVARES, 1996):

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

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

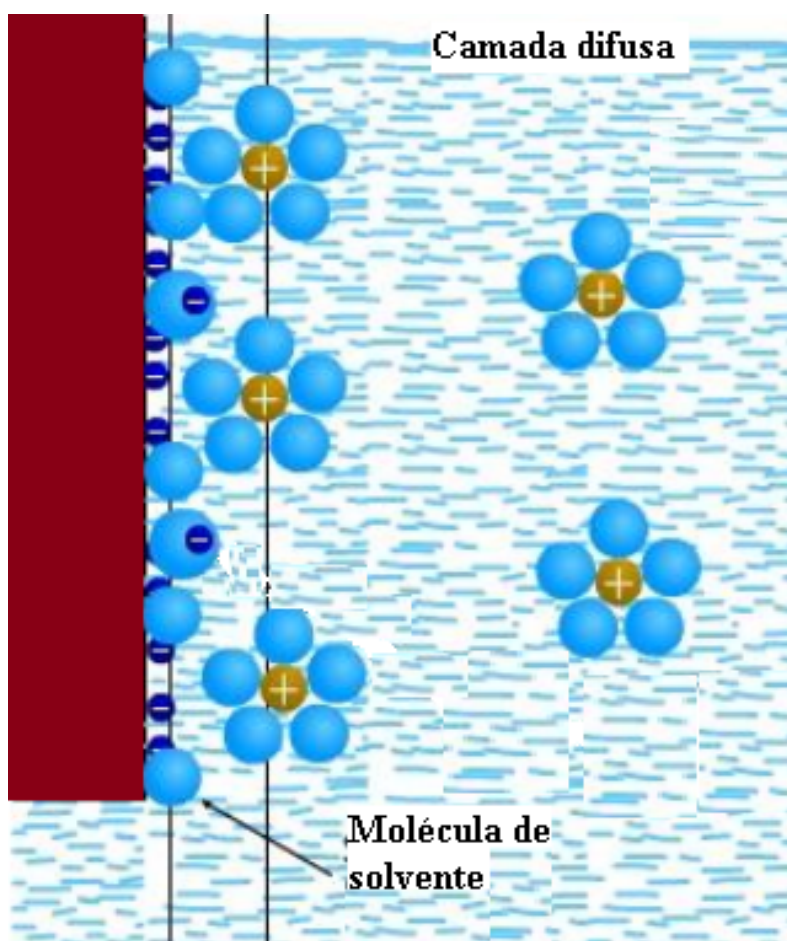
$$\text{Equação 2:} \quad v_{ef} = \mu_{ef} \times E$$

As funções de distribuição são dependentes da magnitude das constantes de dissociação do soluto (pK_a), além de determinar a predominância, num intervalo de pH, de várias espécies. Sendo assim, a equação 2 evidencia uma dependência indireta entre mobilidade efetiva e o pH do meio (TAVARES, 1996). Os conceitos de mobilidade efetiva e a velocidade eletroforética específica são extremamente importantes, porque a separação entre espécies com mobilidades eletroforéticas semelhantes é possível por meio da modificação da fração molar pela escolha do pH do BGE adequado (RIBEIRO, 2017).

1.2.2 Fluxo eletrosmótico (EOF) e sua importância em CE

O movimento dos analitos em direção aos eletrodos de carga oposta é devido a formação de uma corrente gerada no interior do capilar a partir da aplicação de um potencial elétrico. Nas separações em CE ocorre um fenômeno de dupla camada elétrica, gerando o fluxo eletrosmótico (EOF) (BARD; FAULKNER, 1980; BAKER, 1995). Os íons adsorvem na superfície ionizada do capilar e formam a dupla camada elétrica (TAVARES, 1996), representada na figura 1.

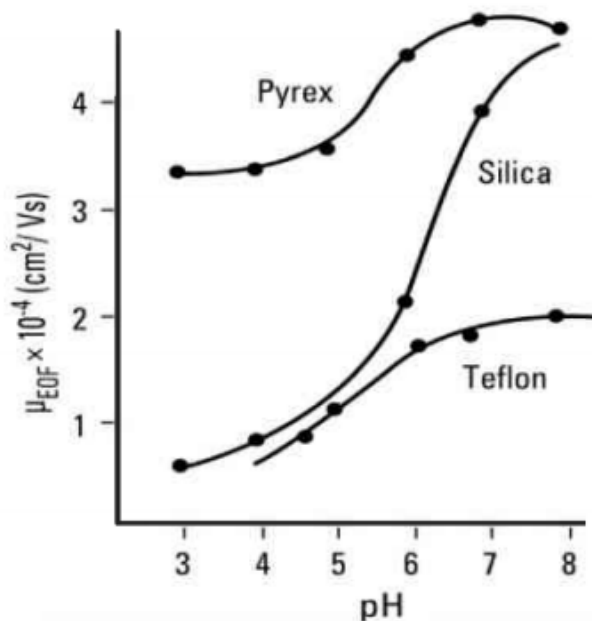
Figura 1 – Representação esquemática da formação da dupla camada elétrica.



Fonte: Adaptado de DISCIPLINAS USP.

A presença de vários grupos silanóis (SiOH) residuais na superfície interna do capilar que permite a formação da dupla camada elétrica. Esses grupos apresentam um caráter ácido, com pK_a aproximado em 6, considerado relativamente fraco. Alguns desses grupos são ionizados quando em contato com o meio aquoso. Sendo assim, com a ionização, a superfície do capilar se torna negativamente carregada e estes grupos poderão estar totalmente protonados ou parcialmente protonados ou ainda totalmente desprotonados, dependendo do pH do eletrólito de corrida (RIBEIRO, 2017). A Figura 2 mostra o efeito do pH sobre a mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.

Figura 2 – Efeito do pH na mobilidade do EOF em capilares de diferentes materiais.

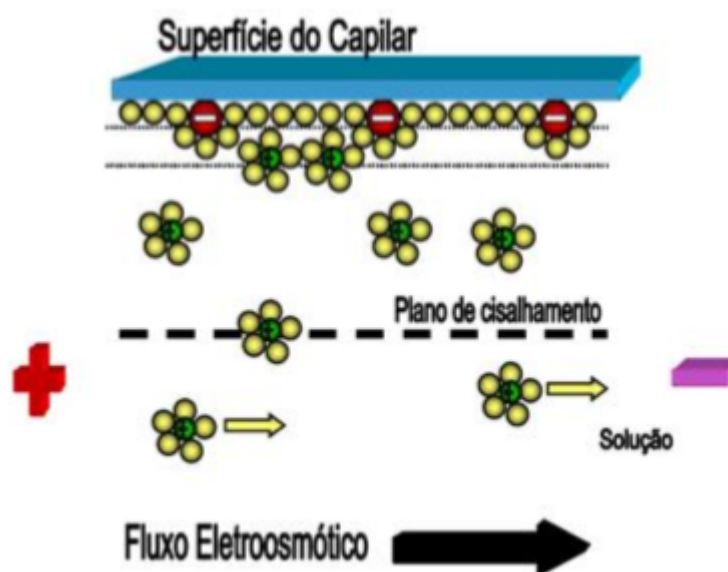


Fonte: Adaptado de HEIGER (1997)

Os cátions, ânions e até mesmo as substâncias neutras que não são atraídas pelos polos, se deslocam em direção ao detector devido ao fenômeno eletroforético do EOF que é capaz de provocar um fluxo de solução dentro da coluna capilar, arrastando os analitos e substâncias presentes na solução (TAVARES, 1996).

Aliado ao diâmetro interno do capilar na ordem de micrometros, a aplicação de um campo elétrico longitudinal inicia um processo de migração dos íons do BGE envolvidos na formação da dupla camada elétrica para os polos de carga oposta. Essa migração de íons, na qual ocorre o transporte de moléculas de água que induz um fluxo de solução como um todo, é o EOF. As cargas mais próximas da parede do capilar não migram, no entanto, as cargas positivas da camada difusa são arrastadas em direção ao cátodo (polo negativo) e esse fluxo é chamado de EOF normal (RIBEIRO, 2017), exemplificado na figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.



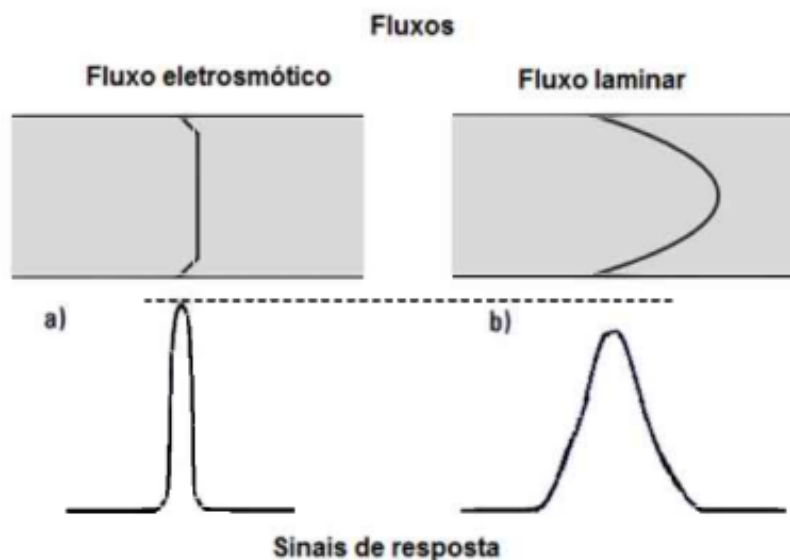
Fonte: MARRA, 2014

Pelo fato de estarem próximas ao capilar e sofrerem adsorção na superfície do mesmo, as cargas não migram. Sendo assim, utilizando a EOF normal, há uma maior migração líquida de cátions em direção ao cátodo se comparada com a migração líquida de ânions em direção ao ânodo. Isso ocorre pois na migração dos cátions, a mobilidade do fluxo se soma a mobilidade do cátion; o contrário do que ocorre com a migração dos ânions (MARRA, 2014).

Em relação a análise de ânions com mobilidade elevada é indispensável, a não ser que a velocidade do EOF seja reduzida, que haja a inversão do EOF para que a análise ocorra em tempos mais aceitáveis ou até mesmo que seja possível (KUBA'N, et al. 2014). Dessa maneira, o método mais utilizado para a inversão é a adição de tensoativos catiônicos ao BGE. Ainda que seja o método mais utilizado são poucos os trabalhos que se dedicam a explicar o mecanismo da inversão do fluxo (KANETA; TANAKA; TAGA, 1993; LUCY, 1996; TAVARES, 1997).

Diferentemente do fluxo laminar ou parabólico, que é gerado por pressão em toda técnica em que utiliza bombas, como o HPLC, o fluxo eletrosmótico tem um perfil planar. Tal característica possibilita uma menor dispersão de bandas por ação do fluxo tornando a CE uma técnica de maior eficiência se comparada com a HPLC (MARRA, 2014).

Figura 4 – Perfil de fluxo gerado pelo EOF (a) e fluxo gerado por pressão (b), e suas correspondentes zonas de amostras.



Fonte: RIBEIRO, 2017

O EOF pode ser afetado por alguns fatores, como por exemplo o campo elétrico. Esse fator afeta proporcionalmente a velocidade e eficiência do fluxo, e inversamente o tempo de análise (HEIGER, 1997). Além do campo elétrico o EOF pode ser influenciado pelo pH das soluções, assim como pela falta de limpeza adequada do capilar antes das análises.

1.3 Eletroforese capilar de zona (CZE)

A CZE, eletroforese capilar de zona ou eletroforese capilar em solução livre, que é o método utilizado nesse trabalho, é um dos modos de separação mais utilizado nas práticas laboratoriais. Isso ocorre principalmente por ser um método simples e de alta facilidade de implementação (RIBEIRO, 2017). O mecanismo de separação desse método é por um capilar preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes, e pelas diferenças de mobilidades, os analitos formam diferentes zonas ao longo do capilar (MGGUFFIN; TAVARES, 1997; TAVARES; MGGUFFIN, 1994).

O método da CZE possui uma pequena limitação quando se trata de moléculas neutras, que não são separadas sem o uso, por exemplo, de um agente complexante

ou derivatizações. Por outro lado, o método apresenta uma ótima vantagem: a determinação de cátions e ânions é feita simultaneamente (TAVARES, 1997).

1.4 Determinação simultânea de cátions e ânions

A determinação simultânea de cátions e ânions tem sua importância vinculada a análise de fármacos, uma vez que cerca de metade das moléculas farmacológicas existentes no mercado é formada por compostos iônicos (KOENKA et al, 2016). E o responsável pela análise simultânea ser possível é o EOF que conduz os solutos até o detector (KOENKA et al, 2016) (WEEKLEY; FOLEY, 2007).

A análise desses fármacos deve ser feita desde o princípio, no seu desenvolvimento, até o controle de qualidade, pois a possível presença de impurezas provenientes do processo de fabricação ou da catálise do fármaco pode afetar as propriedades do mesmo, causando efeitos indesejáveis no usuário do medicamento (DIONEX.com).

A técnica mais utilizada para a determinação de fármacos é a HPLC. Porém é um método que necessita de instrumentação mais complexa, como exemplo, os injetores duplos, e diferentes tipos de eluente e/ou coluna (SAARINORDHAUS; ANDERSON, 1991). Sendo assim, geralmente é utilizado o método da CE com detecção condutométrica (o qual foi empregue nesse trabalho) que evita alguns dos obstáculos citados.

1.5 Sistemas de detecção em CE

O sistema de detecção em CE, assim como em qualquer outra técnica, é de extrema importância, uma vez que com um método de separação com alto desempenho, a detecção precisa ser de grande eficiência e totalmente adequado a técnica. O ideal é que o sistema de detecção possua maior detectabilidade e seja o mais seletivo em relação as espécies (RIBEIRO, 2017).

No geral, os sistemas de detecção utilizados em CE são os mesmos que os usados em HPLC, e são classificados em 3 diferentes métodos: método ópticos, métodos eletroquímicos e métodos acoplados (DA SILVA, 2003). Para a escolha do método de detecção utilizado é preciso levar em consideração diversos critérios, como por exemplo, a seletividade do detector, a linearidade da faixa de resposta e os limites

de detecção (LOD) (SKOOG, 1998). A Tabela 1 mostra alguns valores típicos de LOD para os sistemas mais utilizados em CE.

Tabela 1 – Faixa de limites de detecção (LOD) de sistemas de detecção em CE.

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

Fonte: Adaptada de MARRA, 2014

O método de detecção perfeito não existe. No entanto os métodos de detecção fluorimétricos são considerados os mais ideais pelo fato de serem mais sensíveis, mesmo que geralmente necessite de derivatizações dos componentes das amostras antes da análise (HENDERSON, 2009).

1.6 Detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C⁴D)

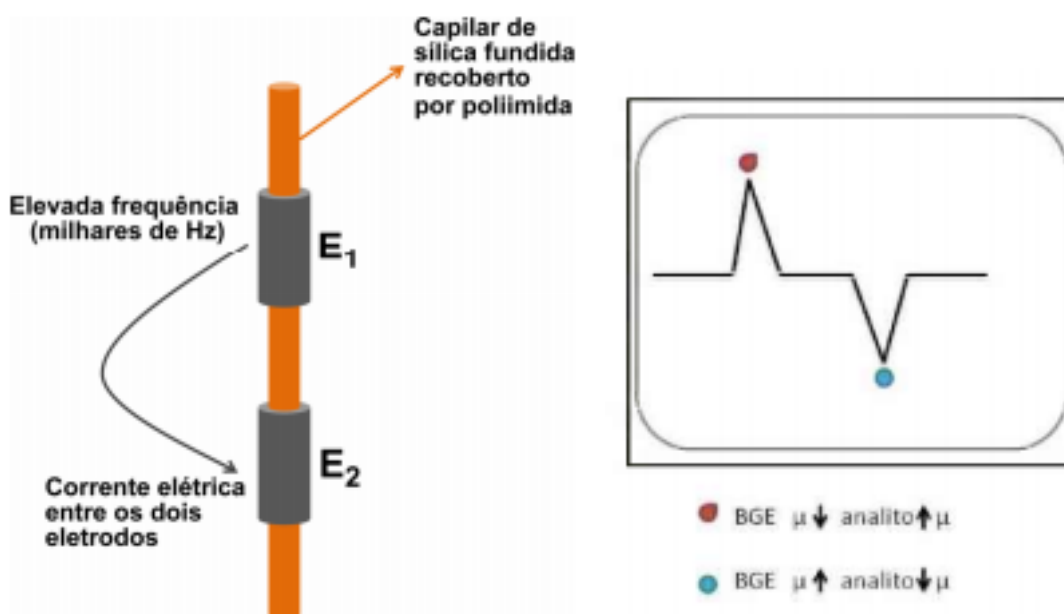
Em 1980, mediante os problemas enfrentados nos sistemas de detecção eletroquímico convencional e ópticos, foi proposto um sistema de detecção baseado na aplicação de sinais de rádio frequência (RF), em que o sinal obtido era resposta da passagem de espécies iônicas pela coluna capilar (GAS et al, 1980). Tal sistema tinha como objetivo um detector condutométrico sem contato de alta frequência dedicado à isotacoforese, mas não obteve sucesso (MARRA, 2014).

Assim, em 1998, pesquisadores descreveram a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C⁴D, do inglês capacitively coupled contactless

conductometry detection) (ZEMANN et al., 1998; DA SILVA; DO LAGO, 1998). Com esse sistema, diferentemente dos detectores condutométrico convencionais, que haviam necessidade de contato, foi possível que não houvesse a necessidade de perfuração do capilar com laser em CO₂, já que a instalação dos eletrodos é feita na parte externa do capilar (HUANG et al., 1987; HUANG et al., 1991; HUANG; ZARE, 1991). Pelo fato do detector não estar em contato com o BGE e nem com os padrões e amostras que fluem no capilar foi possível obter melhor estabilidade e resposta analítica já que o risco de contaminação foi eliminado e houve a diminuição da interferência do campo elétrico utilizado na separação das espécies no sistema de CE (BRITO-NETO et al, Part. 1 e 2, 2005).

Como mostra a Figura 5, a detecção C⁴D é baseada no acoplamento de dois eletrodos tubulares metálicos externos ao capilar de sílica fundida (DA SILVA; DO LAGO, 1998).

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



Fonte: Adaptada de RIBEIRO, 2017.

Neste tipo de detector é aplicado um sinal senoidal de alta frequência em um dos eletrodos. Uma corrente elétrica proporcional à condutividade passa de um eletrodo ao outro devido as espécies iônicas do eletrólito e da amostra presentes.

Posteriormente essa corrente gerada é conduzida ao circuito eletrônico, e após o tratamento do sinal analítico, a corrente é levada, por meio de uma interface, para o dispositivo de registro (DA SILVA; DO LAGO, 1998; DA SILVA; DO LAGO, 2000; BRITO-NETO; DA SILVA; BLANES; DO LAGO, 2005).

O mecanismo de detecção de espécies em C^4D se baseia na substituição do co-íon presente no BGE pelo íon a ser analisado. Em casos que o analito apresente mobilidade maior que a do co-íon do BGE ocorre um aumento da condutividade, registrando um sinal positivo. O inverso também é válido, caso a mobilidade do analito seja menor que a do co-íon do BGE, o sinal registrado será negativo. O BGE possui um papel importante na sensibilidade de cada analito, uma vez que quanto maior a diferença da mobilidade do eletrólito em relação ao analito, maior será a sensibilidade do detector (RIBEIRO, 2017).

1.7 Análises rápidas por CE

As análises por CE possuem uma alta eficiência que permite desenvolver métodos rápidos, obtendo uma separação na ordem de segundos (MARRA, 2014). Para tornar essas análises mais rápidas geralmente são usadas duas estratégias, sendo elas a utilização de instrumento com vários capilares (MARSH; ALTRIA, 2006) que permite realizar a separação simultânea de várias amostras, e o uso de capilares com comprimentos reduzidos (OPEKAR; COUFAL; STULIK, 2009).

Pela equação 3, onde (l) é o comprimento efetivo do capilar, (L) é o comprimento total do capilar e (E) é o campo elétrico aplicado, percebe-se a influência do potencial e do comprimento do capilar. O tempo de migração (t_m) das espécies será reduzido se houver um aumento do potencial aplicado ou a redução do comprimento do capilar e seu diâmetro interno (MATYSIK, 2010).

$$\text{Equação 3: } t_m = \frac{lL}{E(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

1.8 Espécies estudadas

Neste trabalho foram estudadas duas espécies diferentes, associadas a um medicamento. As espécies em questão são hidroclorotiazida e metoprolol. A

hidroclorotiazida tem demonstrado um efeito anti-hipertensivo aditivo quando administrada em adição ao metoprolol. O metoprolol é absorvido completamente pelo organismo e sofre metabolismo oxidativo no fígado, enquanto apenas 60-80% da hidroclorotiazida é absorvida com biodisponibilidade no trato gastrointestinal, e não é metabolizada. (ANVISA, 2015).

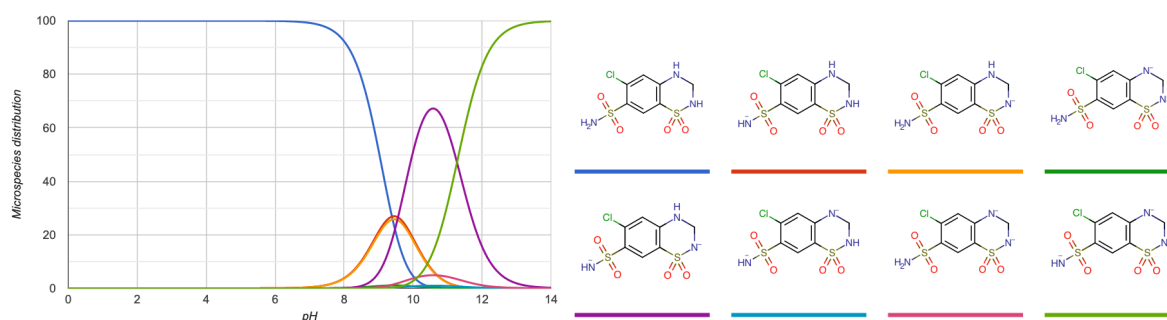
1.8.1 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCT) é um diurético tiazídico muito utilizado no tratamento da hipertensão arterial, seja isoladamente ou em associação com outros fármacos anti-hipertensivos. Pode ser ainda utilizado no tratamento dos edemas associados à insuficiência cardíaca, cirrose hepática e à terapia por corticosteroides ou estrógenos (ANVISA, 2015).

Com a fórmula molecular de $C_7H_8ClN_3O_4S_2$, massa molar de 297,73 g/mol (CHEMICALIZE.ORG) e apresentando um ponto de fusão próximo de 270 °C (TAGLIARI, 2008), a HCT é comumente encontrada comercialmente nas concentrações de 25 e 50 mg, ou então associada a outros fármacos anti-hipertensivos. A HCT só é encontrada na forma de comprimidos, não existindo nenhuma forma farmacêutica líquida (KOROLKOVAS e FRANÇA, 2007). Isso pelo fato de que a hidroclorotiazida é insolúvel em água, possibilitando apenas sua formulação sólida ou em suspensão. No entanto o desenvolvimento do medicamento na forma de suspensão é uma etapa crítica devido a instabilidade da HCT em água, que pode comprometer a estabilidade da formulação (MOLLICA et al., 1971).

A HCT possui três pKa's, $pK_{a1} = 9,09$, $pK_{a2} = 9,83$ e $pK_{a3} = 11,31$. A distribuição das espécies de HCT estão representadas na figura 6.

Figura 6 – Diagrama de distribuição das espécies vs pH para a hidroclorotiazida (HCT) e suas respectivas espécies.



Fonte: www.chemicalize.org.

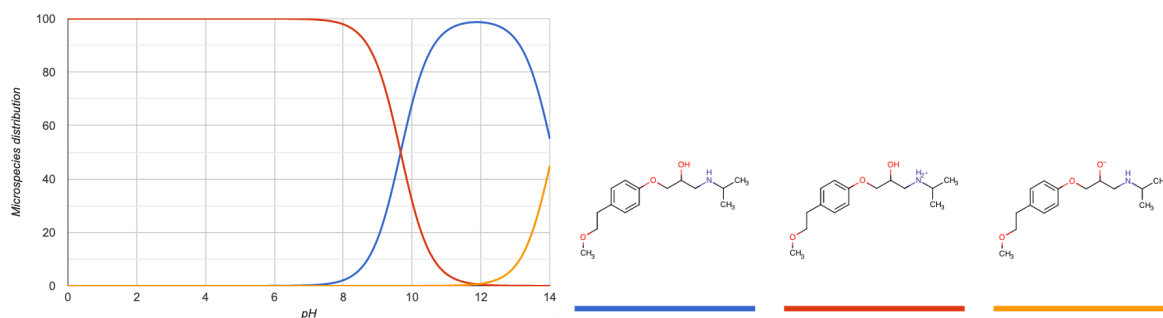
1.8.2 Metoprolol

O metoprolol (MET) [1-isopropilamino-3-[4-(2-metoxietil)fenoxi]propano-2-ol], de forma molecular $C_{15}H_{25}NO_3$, é um bloqueador beta-1 seletivo, ou seja, bloqueia os receptores beta-1 em doses excepcionalmente menores que as necessárias para bloquear os receptores beta-2. O MET é administrado na forma racêmica, sendo utilizado para o tratamento de hipertensão sistêmica, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (ANVISA, 2014; MOSTAFAVI E FOSTER, 2000).

O metoprolol é encontrado comercialmente como succinato de metoprolol ou tartarato de metoprolol, em que o primeiro equivale a 95% do segundo composto, ou seja, 100mg de tartarato equivale a 95mg de succinato (ANVISA, 2014). O tartarato de metoprolol que é um pó cristalino branco possui ponto de fusão entre 121 °C e 124 °C e é solúvel tanto em água quanto em etanol e clorofórmio. (FARMACOPEIA BRASILEIRA IV, 2003).

O MET possui dois pKa's, $pK_{a1} = 9,67$ e $pK_{a2} = 14,09$. A distribuição das espécies de metoprolol estão representadas na figura 7.

Figura 7 – Diagrama de distribuição das espécies vs pH para metoprolol (MET) e suas respectivas espécies.



Fonte: www.chemicalize.org.

1.9 Formulações farmacêuticas estudadas

Comumente é encontrado princípios ativos associados em uma única formulação farmacêutica devido a existência do efeito sinérgico. Conceitualmente, sinergismo caracteriza a interação entre duas drogas que quando administradas concomitantemente, a eficácia ou potência resultante suporta uma interação maior do que aditivo ou multiplicativo comparado com cada fármaco administrado individualmente (RAFFA; STONE; TALLARIDA, 2000).

O metoprolol reduz a pressão arterial elevada em pacientes na posição supina tanto quanto na ortostática, por ser um bloqueador beta-1 seletivo. Quando administrado com 100mg de metoprolol, 12,5mg de hidroclorotiazida tem demonstrado um efeito anti-hipertensivo aditivo (ANVISA, 2015).

Na literatura estão disponíveis alguns métodos para a determinação simultânea de hidroclorotiazida (HCT) e metoprolol (MET), sendo a maioria pelo método do HPLC em que o tempo de análise é relativamente alto se comparado a métodos como o proposto nesse trabalho. Um método que faz a determinação simultânea dos compostos em poucos segundos permite que empresas com menor poder aquisitivo implementem a metodologia desenvolvida, por ter menor custos de aquisição, operação e manutenção e possa otimizar o tempo de trabalho no controle de qualidade da formulação farmacêutica.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi desenvolver um método prático, simples e de baixo custo para a determinação simultânea de hidroclorotiazida e metoprolol em fármacos por meio do método da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e amostras

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, sendo então usados sem purificação prévia. A água deionizada (18 MΩ cm) foi obtida por meio de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). Na tabela 2 estão listados todos os reagentes utilizados e suas respectivas empresas.

Tabela 2 – Relação de reagentes e empresas onde foram adquiridos.

Reagentes	Empresas
(TAPS)	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
Hidróxido de sódio (NaOH)	Panreac (Castellar del Vallès, Spain)
Ácido Bórico (H_3BO_3)	Panreac (Castellar del Vallès, Spain)
(TRIS)	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
(CHES)	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
Metanol	Synth (Diadema - Brazil)
Metoprolol	Infinity Pharma (São Paulo, SP, Brasil)
Hidroclorotiazida	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)

Fonte: A autora.

Uma vez que a HCT é insolúvel em água, para manter um padrão, as soluções estoque de MET e HCT foram preparadas utilizando metanol para uma concentração de 10 mmol/L. Para a preparação da amostra também foi necessária a utilização de metanol para solubilização do sal. Tanto a amostra como os padrões permaneceram no ultrassom até solubilização, por cerca de 5 minutos.

A solução tampão escolhida e utilizada era composta de ácido bórico 10 mmol/L e hidróxido de sódio 4mmol/L para pH=9,0. Entretanto para o estudo do BGE foram preparadas soluções com TRIS/TAPS e CHES.

3.2 Instrumentação

Todos os resultados obtidos foram a partir de um equipamento de CE-C⁴D construído no laboratório do Professor Claudimir Lúcio do Lago do departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP. O equipamento fornecido conta com dois detectores condutométricos sem contato compactos e de alta resolução acoplados capacitivamente (DA SILVA; DO LAGO, 1998; FRANCISCO; DO LAGO, 2009).

A figura 8 descreve o equipamento utilizado nos trabalhos realizados (a) e o esquema do sistema de CE-C⁴D (b).

Figura 8 – Equipamento de CE-C⁴D utilizado na realização dos experimentos (a) e esquema do sistema (b).



Fonte: MARRA, 2014.

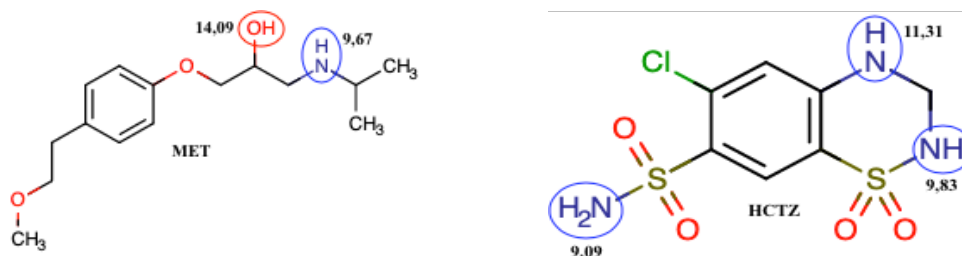
As injeções foram feitas por pressão positiva (hidrodinamicamente) no lado direito do equipamento. O capilar de sílica fundida utilizado, que contém detectores a 10 cm de cada extremidade, tinha em torno de 50 cm de comprimento total, 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA, EUA).

Antes das análises o capilar passou pelo processo de lavagem com NaOH 0,1 mol/L por cerca de 15 minutos e posteriormente com água deionizada durante 10 minutos. Logo após é injetado o BGE a ser utilizado durante 10 minutos. As amostras foram injetadas com pressão constante de 25 kPa por 1,0 s. Todos os ensaios foram realizados com a aplicação de uma diferença de potencial de +25 kV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com a literatura (SWAIN, 2019), os valores de pKa para a HCT foram $\text{pKa}_1 = 9,09$, $\text{pKa}_2 = 9,83$ e $\text{pKa}_3 = 11,31$, e para o MET foram $\text{pKa}_1 = 9,67$ e $\text{pKa}_2 = 14,09$. Esses valores são representados na Figura 9.

Figura 9 – Estruturas e valores de pKa para hidroclorotiazida (HCT) e metoprolol (MET).



Fonte: CHEMICALIZE.ORG

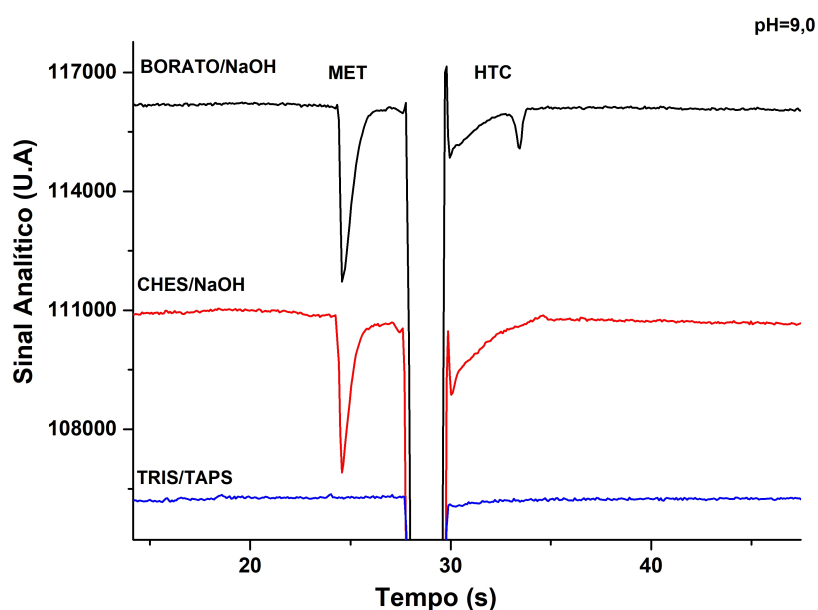
A partir das curvas de distribuição (figura 6 e figura 7) sabemos que os compostos podem existir na sua forma iônica, sendo assim podem ser separados por eletroforese capilar de zona. A HCT apresenta um caráter básico forte e sua forma aniônica se encontra em valores de pH superiores a 6,9. Enquanto o MET apresenta um caráter anfótero e pode existir tanto na sua forma catiônica, com valores de pH inferiores a 11,8, e na sua forma aniônica com valores de pH superiores a 11,8.

Para que fosse possível a separação simultânea dos dois analitos foi feita a análise preliminar das faixas de pH. Visto que a separação só é possível quando os analitos estejam ionizados, a melhor faixa de pH para o procedimento seria entre 8,5

– 9,8, em que a HCT se encontra carregada negativamente, resultando em um pico após o EOF, e o MET carregado positivamente sendo registrado antes do EOF. Essa diferença de picos é explicada pela atração do MET (carregado positivamente) com o polo negativo (cátodo) do eletrodo originando uma somatória de velocidades, enquanto a HCT (carregada negativamente) é repelida pelo polo negativo, subtraindo a velocidade eletroforética à do EOF.

Inicialmente foram testados 3 compostos que seriam ideais como BGE, dentro da faixa de pH determinada. O primeiro BGE foi composto por 20 mmol/L de H_3BO_3 com 5mmol/L de NaOH para pH = 9,0. Um segundo, composto por 20 mmol/L de CHES com 6 mmol/L de NaOH para pH = 9,1. E por fim um BGE composto por 20 mmol/L de TRIS/TAPS com 5mmol/L de NaOH para pH = 8,9. O eletroferograma registrados para cada BGE se encontra na figura 10.

Figura 10 – Eletroferogramas de uma solução padrão composta por 100 $\mu\text{mol/L}$ de HCT e 175 $\mu\text{mol/L}$ de MET, BGE's: (i) 20 mmol/L de H_3BO_3 com 5 mmol/L de NaOH, (ii) 20 mmol/L de CHES com 6mmol/L de NaOH e (iii) 20 mmol/L de TRIS/TAPS como 5mmol/L de NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.

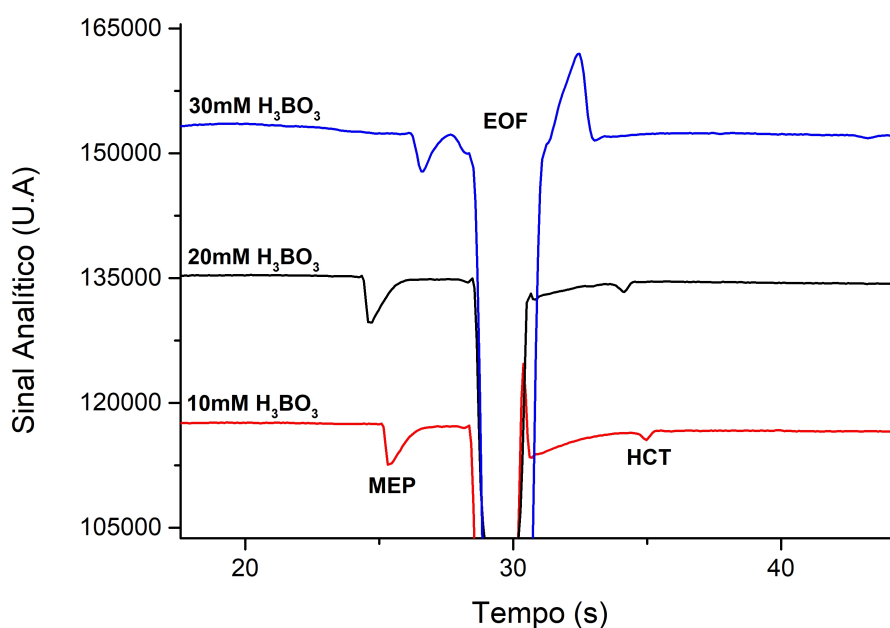


Fonte: A autora.

A partir da figura 10, percebemos que tanto o BGE composto por CHES como o composto por TRIS/TAPS não foram eficientes por não apresentarem um ou dois picos, respectivamente, dos analitos. Isso ocorre devido as mobilidades semelhantes dos analitos. Enquanto o BGE composto por H_3BO_3 se mostrou rápido e eficiente na separação dos analitos. Por isso, o escolhido foi o tampão de H_3BO_3 com NaOH para a determinação da HCT e do MET.

Sendo assim, foi feito um estudo da concentração de ácido bórico no BGE, como mostrado na Figura 11.

Figura 11 – Eletroferogramas da composição do BGE utilizando uma solução padrão de $100\mu\text{mol/L}$ HCT e $175\mu\text{mol/L}$ MET. BGE: 10, 20 e 30 mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH em pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por 1,0s. Potencial de separação: +25kV (lado da injeção). EOF: normal.



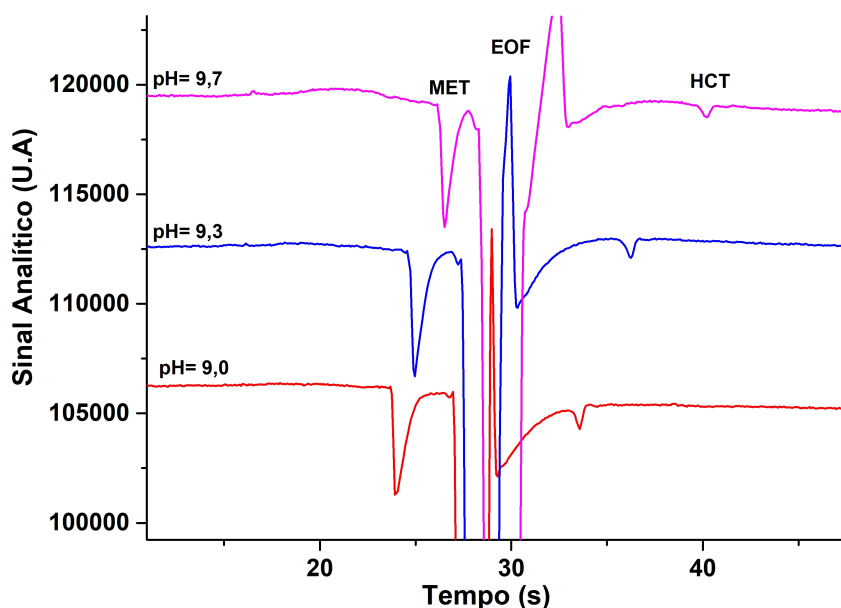
Fonte: A autora.

Observou-se que o pico de HCT não apareceu no eletroferograma utilizando BGE de ácido bórico na concentração de 30 mmol/L, tornando-o ineficiente no estudo. Por outro lado, as concentrações de 20 mmol/L e 10 mmol/L quase não influenciaram no tempo de análise e na separação dos analitos.

Posteriormente, foi feito um estudo da faixa de pH ideal utilizando o BGE composto por 10mmol/L de ácido bórico, que foi determinado, até então, como o mais

eficiente para a separação, ajustado com hidróxido de sódio. O eletroferograma está representado na figura 12.

Figura 12 – Eletroferogramas do efeito da variação de pH na separação de HCT e MET, utilizando uma solução padrão de 100 $\mu\text{mol/L}$ de HCT e 175 $\mu\text{mol/L}$ de MET. BGE: ácido bórico 10 mmol/L ajustado com NaOH. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.

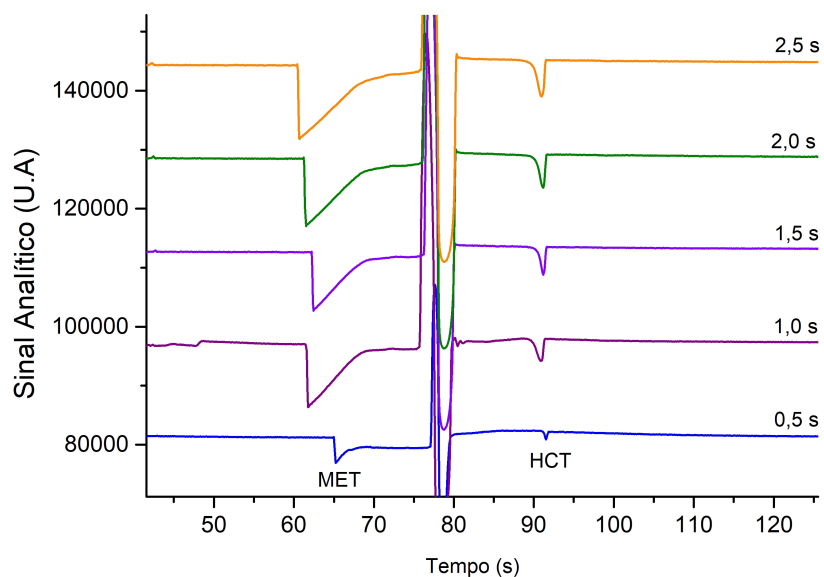


Fonte: A autora.

A separação dos dois compostos com os melhores picos foi possível em $\text{pH} = 9,0$. Como mostrado no eletroferograma o aumento do pH do BGE desloca o pico do MET para próximo ao sinal do EOF já que a sua forma protonada é convertida na forma neutra, como foi apresentado na figura 7. Por outro lado, a HCT não sofre muita influência na resolução dos seus picos, mas em relação ao tempo de migração e a sensibilidade do pico é perceptível que com o aumento do pH há um aumento do tempo e uma piora na sensibilidade, respectivamente.

Logo após foi feito o estudo para definição do melhor tempo de injeção. A figura 13 mostra o teste realizado.

Figura 13 – Eletroferogramas do tempo de injeção da solução padrão de MET e HCT, utilizando uma solução padrão de 300 $\mu\text{mol/L}$ de HCT e 900 $\mu\text{mol/L}$ de MET. BGE: 10 mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH em pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 s a 2,5 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção) EOF: normal.

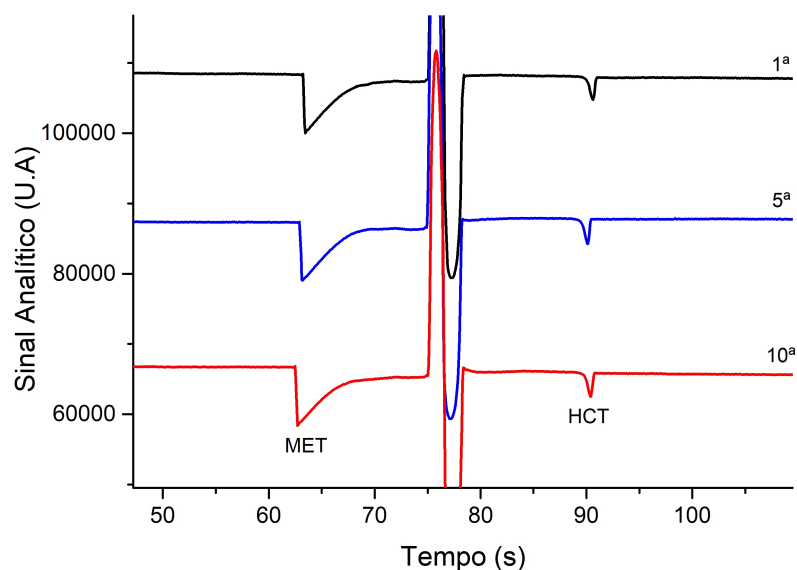


Fonte: A autora.

À medida que aumenta o tempo de injeção a área dos picos também aumenta, uma vez que uma maior quantidade de analito é injetada no capilar. Com isso, em alguns casos, os tempos de injeção elevados afetam negativamente a resolução dos picos, tornando-os indesejados. Nesse estudo, em questão, os picos no intervalo de 1,0 s – 2,0 s não sofreram influência negativa quanto a resolução. Sendo assim foi escolhido o tempo de injeção de 1,0 s.

Depois de avaliado as melhores condições dos parâmetros deu-se continuidade com o estudo de repetibilidade para verificar a estabilidade do sistema. A performance do sistema é mostrada na figura 14 com o primeiro, quinto e décimo eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão de MET e HCT nas concentrações 900 $\mu\text{mol/L}$ e 300 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. A tabela 3 exhibe os resultados estatísticos calculados a partir dos eletroferogramas.

Figura 14 – Eletroferogramas do estudo de repetibilidade com dez injeções sucessivas utilizando uma solução padrão de 300 $\mu\text{mol/L}$ de HCT e 900 $\mu\text{mol/L}$ de MET. BGE: 10 mmol/L de ácido bórico ajustado com hidróxido de sódio para um pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.

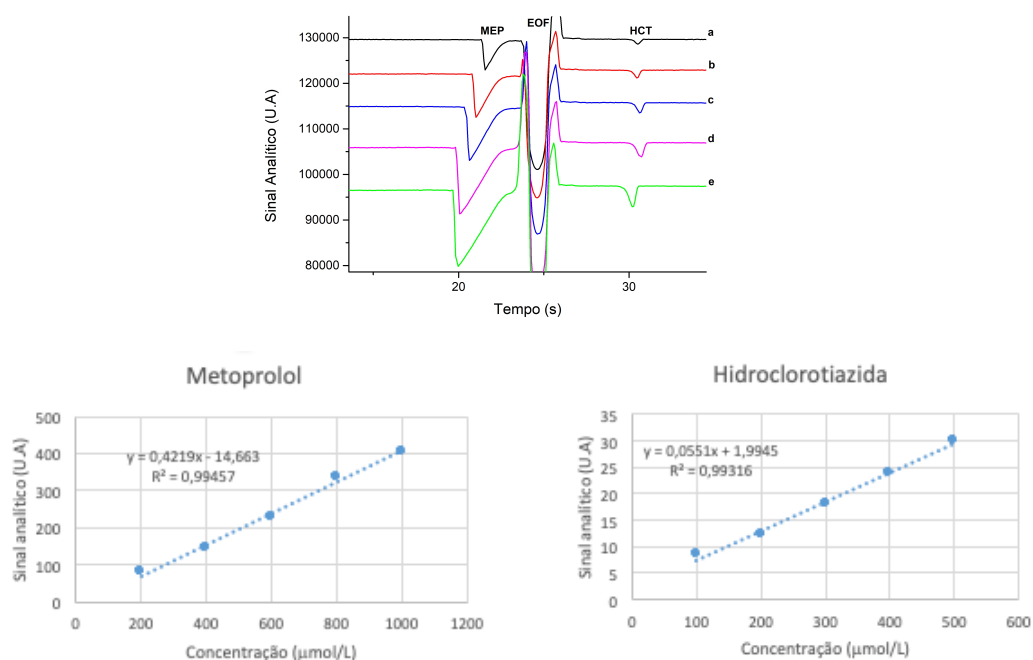


Fonte: A autora.

Com esse estudo ficou evidente a boa estabilidade do método proposto, com desvios padrões inferiores à 5% e 1% em relação a área e a tempo de migração, respectivamente. Isto revela que não há necessidades da retirada do BGE do capilar ao longo de dez análises sucessivas.

Posteriormente foi analisado a linearidade do método proposto, mostrado na figura 15. Uma faixa de concentração (a – e) foi selecionada para se construir as curvas de calibração, as quais apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,994 e 0,993 para o metoprolol e hidroclorotiazida, respectivamente.

Figura 15 – Eletroferograma obtido a partir da injeção de soluções padrão de MET e HCT e suas respectivas curvas analíticas. Concentrações crescentes: (a-e: 100 – 500 $\mu\text{mol/L}$) de HCT e (a-e: 200 – 1000 $\mu\text{mol/L}$) de MET. BGE: 10mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH em pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.



Fonte: A autora.

Tabela 3 – Parâmetros analíticos do método proposto.

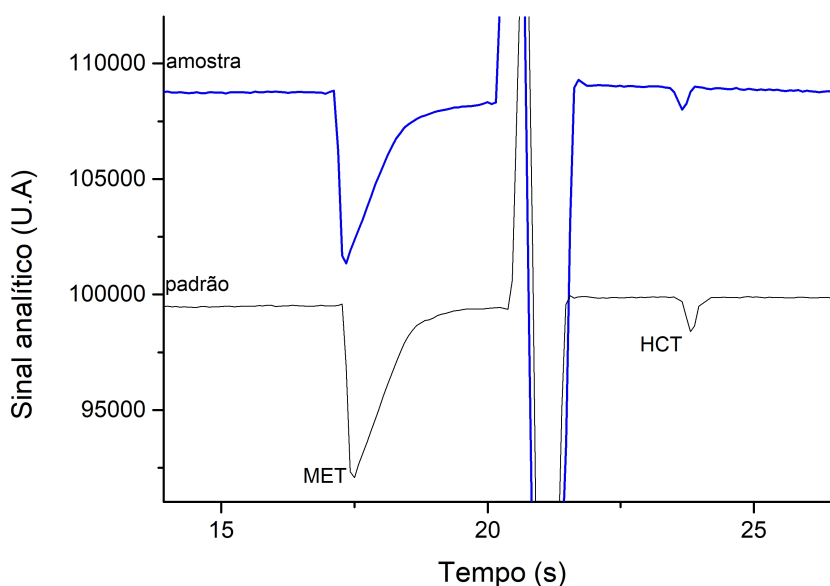
Parâmetros	MET	HCT
Tempo de migração (s)	20,2 $\pm$ 0,3	30,6 $\pm$ 0,3
Resolução ^a	2,27 $\pm$ 0,09	5,84 $\pm$ 0,03
Coefficiente de correlação	0,9946	0,9932
Faixa linear ($\mu\text{mol/L}$)	200-1000	100-500
LOD ($\mu\text{mol/L}$)	65	30
LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	200	100
Frequência analítica (h^{-1})	95	95
Intra-dias DPR (n = 10)	4,6%	4,8%

^aResolução entre o pico correspondente e o anterior.

Fonte: A autora.

Para avaliar a exatidão do método proposto foi feito o estudo de adição e recuperação para uma amostra (tabela 4), a partir das curvas de calibração. Os estudos de adição e recuperação apresentaram ótimos resultados com recuperação de 102% para MET e 95% para HCT, indicando ausência de efeitos de matriz nas amostras.

Figura 16 – Eletroferogramas obtido com injeção de uma solução padrão e amostra de 900 μ mol/L de MET e 300 μ mol/L de HCT. BGE: 10mmol/L de ácido bórico ajustado com NaOH para pH = 9,0. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por 1,0s. Potencial de separação: +25kV (lado da injeção). EOF: normal.



Fonte: O autor.

Tabela 4 – Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de MET e HCT via CE-C⁴D.

AMOSTRA	BULA (mg por cápsula)	CE (mg)	ERRO (%)
MET	100	96 ± 3	-3,9
HCT	12,5	13,2 ± 0,4	5,4

Erro: diferença entre o CE-C⁴D proposto e o valor da bula.

Fonte: A autora.

5. CONCLUSÃO

Esse trabalho propôs um método simples e rápido para determinação simultânea de HCT e MET em amostras farmacêuticas utilizando a CE-C⁴D. Os resultados obtidos pelo teste de recuperação, os quais podem ser considerados satisfatórios (entre 95% e 102%), mostram a eficácia do método, assim como os dados de limite de detecção serem adequados para a finalidade do método. Além disso o método proposto apresenta uma etapa simples de preparação da amostra (apenas diluição) e tem uma geração mínima de resíduos por causa do baixo volume de amostras e reagentes gastos por análise, resultando em menor impacto ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, v.e.E.B., 2003.

A.D. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER, R.S. CROUCH **Fundamentos de Química Analítica**, Thonson, Learning, 2014. Tradução da 9a ed. norte americana.

Brazilian National Health Surveillance Agency (**ANVISA**), Resolution n. 47(2015)

BARD, A.J., FAULKNER, L.R., **Electrochemical Methods**. John Wiley & Sons, New York, 1980.

BAKER, D.R., **Capillary Electrophoresis**. John Wiley & Sons, New York, 1995.

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

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

CUNHA, R. R. **Desenvolvimento de métodos rápidos para determinação de Codeína, Diclofenaco e seus contra-íons por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)**. Dissertação (Mestrado em química analítica). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DIONEX. acesso: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/87447-PO-IICS-APICounterion-CAD-18Oct2010-LPN2610-01.pdf>

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

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

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

GAS, B., DEMJANEKO, M., VACIK, J., **high-frequency contactless conductivity detection in isotachophoresis. Journal of Chromatography**, 1980 192(2): p. 253-257.

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

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

HEIGER, D. N. **High Performance Capillary Electrophoresis: An introduction**. Hewlett Packard Company, 1997. Publication Number 12-5091-6199E.

HUANG, X. et al. **On-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis**. *Analytical Chemistry*, v. 59, n. 23, p. 2747-2749, 1987.

HUANG, X. et al. **End-column detection for capillary zone electrophoresis**. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 2, p.189-192, 1991.

HUANG, X.; ZARE, R.N. **Improved end-column conductivity detector for capillary zone electrophoresis**. *Analytical Chemistry*, v. 63, n. 19, p. 2193-2196, 1991.

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

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

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

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

KOROLKOVAS A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007/2008.

KUBAN, P.; HAUSER, P.C. **A review of the recent achievements in capacitively coupled contactless conductivity detection**. *Analytica Chimica Acta*, v. 607, n.1, p. 15-29, 2008.

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

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

MATYSIK, F.M., **Advances in fast electrophoretic separations based on short capillaries**. *Analytical and bioanalytical Chemistry*, 2010 397(3): p. 961-965.

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

MCGUFFIN, V.L.; TAVARES, M.F.M. **Computer-assisted optimization of separations in capillary zone electrophoresis**. Analytical Chemistry, v. 69 n. 2, p. 152-164, 1997.

MARRA, C. M. **Aplicação da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato no controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo aspirina ou dipirona em combinação com outros princípios ativos**. Dissertação (Mestrado em química analítica). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

MOLLIKA, J. A.; REHM, C. R.; SMITH, J. B.; GOVAN, H. K. **Hydrolysis of benzothiadiazines**, Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 60, n. 9, p. 1380-1384, 1971.

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

MOSTAVI, S., LEWANCZUIK, R., FOSTER, R., **Influence of acebutolol and metoprolol on cardiac output and regional blood flow in rats**, 2000.

OPEKAR, F.; COUFAL, P.; STULIK, K. **Rapid capillary zone electrophoresis along short separation pathways and its use in some hyphenated systems: a critical review**. Chemical Reviews, v. 109, n. 9, p. 4487-4499, 2009.

QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. **Eletroforese Capilar**. Chemkeys, 2001.

RIBEIRO, C. A. M. M. **Desenvolvimento de métodos rápidos de análises de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)**. Dissertação (Mestrado em química analítica). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

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

Site da internet disponível em: <<https://chemicalize.com/#calculation>>. Acessado às 21:40 de 22/09/2019

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

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

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

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

TAVARES, M.F.M.; MCGUFFIN, V.L. **Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis.** Journal of Chromatography A, v. 686, n.1, p. 129-142, 1994.

TAGLIARI, M. P., **Desenvolvimento e avaliação da qualidade de suspensões farmacêuticas contendo hidroclorotiazida: avaliação de pacientes pediátricos no Hospital infantil Joana de Gusmão.** Dissertação (pós-graduação em farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.

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

ZEMANN, et al. **Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis.** Analytical Chemistry, v. 70, n.3, p. 563-567, 1998.