

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

MARINA WOHN RATH BRUNELLI ALVARES DA SILVA

**Determinação simultânea de ibuprofeno e arginina por eletroforese
capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).**

UBERLÂNDIA - MG

Março, 2018

MARINA WOHNATH BRUNELLI ALVARES DA SILVA

Determinação simultânea de ibuprofeno e arginina 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

Março, 2018

MARINA WOHNATH BRUNELLI ALVARES DA SILVA

Determinação simultânea de ibuprofeno e arginina 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: ____/____/____ Nota: ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alex Domingues Batista (Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz (Membro)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Assinatura: _____

Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva (Membro)

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir a conclusão do curso de Química Industrial.

Agradeço, em especial, aos meus pais Carlos e Heloísa, por todo o apoio durante o curso, sem eles nada disso seria possível. E também a toda a minha família.

Aos meus colegas de curso por sempre me ajudarem no dia a dia desse curso tão difícil.

A todos os professores do Instituto de Química que compartilharam seus conhecimentos da melhor maneira possível, em especial ao professor Eduardo que me permitiu a realização desse trabalho.

RESUMO

Neste trabalho, a técnica de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (CE-C⁴D) foi utilizada no desenvolvimento de um método rápido de controle de qualidade de arginina (ARG) e ibuprofeno (IBU). O tampão de corrida (BGE) H₃BO₃ 20mmolL⁻¹ ajustado com NaOH para pH = 8,0, foi usado para determinar simultaneamente a composição farmacêutica contendo ibuprofeno (IBU) + arginina (ARG) com tempo de análise inferior a 35 segundos. Os limites de detecção (LQD) foram 30µmolL⁻¹ e 35µmolL⁻¹ para a ARG e IBU, respectivamente. Com Valores de recuperação de 102% para ARG e 100,5% para IBU. O método proposto pode ser usado no controle de qualidade de matérias primas e de formulações farmacêuticas que possuam tais princípios ativos em sua composição.

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

ABSTRACT

In this work, capillary electrophoresis technique with contactless capacitive coupled conductivity detection (CE-C⁴D) was used the development of a fast method of quality control of arginine (ARG) and ibuprofen (IBU). The running background eletrolyte (BGE) H₃BO₃ 20mmolL⁻¹ adjusted with NaOH to pH = 8.0 was used to simultaneously determine a pharmaceutical substance containing ibuprofen (IBU) + arginine (ARG) with analysis time less than 35 seconds. The limits of detection (LQD) was 30µmolL⁻¹ and 35µmolL⁻¹ for ARG and IBU, respectively. Recovery values of 102% for ARG and 100.5% for IBU. The proposed method can be used in quality control of raw materials and pharmaceutical formulations having such compounds in its composition.

Keywords: Simultaneous determination. Quality control. Pharmaceutical samples. Active ingredients. Ibuprofen. Arginine. CE-C⁴D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da formação da dupla camada elétrica.....	16
Figura 2 -	Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.....	17
Figura 3 -	Esquema do sistema de detecção C ⁴ D e representação de um eletroferograma com pico positivo e pico negativo. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.....	20
Figura 4 -	Diagrama de distribuição das espécies vs pH para a arginina (ARG) e suas respectivas espécies.....	22
Figura 5 -	Diagrama de distribuição das espécies vs pH para o ibuprofeno (IBU) e suas respectivas espécies.....	23
Figura 6 -	Equipamento de CE-C ⁴ D utilizado neste experimento.....	27
Figura 7 -	Esquema do sistema de CE-C ⁴ D.....	28
Figura 8 -	Eletroferograma obtido utilizando BGE TAPS (20mmolL ⁻¹) ajustado para pH = 8,0 com NaOH. Concentração de ambos os analitos: 500µmolL ⁻¹ . Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.....	30

Figura 9 -	Eletroferogramas obtidos utilizando: (A) BGE ácido bórico (20mmolL ⁻¹) ajustado com NaOH até pH = 8,0. (B) BGE composto por 30 mmolL ⁻¹ de MES e HIS pH = 6,0. Concentração de ambos os analitos: 500µmolL ⁻¹ . Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.....	31
Figura 10 -	Efeito da variação de pH, com BGE ácido bórico 20mmolL ⁻¹ ajustado com NaOH, na separação de ARG e IBU por CZE. Com concentrações dos analitos de 500µmolL ⁻¹ de ambas as espécies. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s. Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.....	32
Figura 11 -	Estudo da composição do BGE utilizando uma solução padrão de ARG e IBU. Concentrações dos analitos: 500µmolL ⁻¹ . BGE: 10, 20 e 30 mmolL ⁻¹ de ácido bórico ajustado em pH = 8,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por 1,0 s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.....	33
Figura 12 -	Estudo do tempo de injeção de uma solução padrão de ARG e IBU. Concentrações dos analitos: 500µmolL ⁻¹ de ARG e IBU. BGE: 20 mmolL ⁻¹ de ácido bórico ajustado em pH = 8,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 0,5 - 2,5s; Potencial de separação: +25 kV (lado da injeção). EOF: normal.....	34
Figura 13 -	Estudo da aplicação de potencial em uma solução padrão de 500µmolL ⁻¹ ARG e IBU. BGE: 20 mmolL ⁻¹ de ácido bórico ajustado em pH = 8,0. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa variando de 15 – 25kV; Tempo de injeção: 1,0s. EOF: normal.....	35

Figura 14 - Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo ARG ($500\mu\text{molL}^{-1}$) e IBU ($500\mu\text{molL}^{-1}$). BGE: 20 mmolL^{-1} de ácido bórico ajustado em $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0\text{ s}$. Potencial de separação: $+25\text{ kV}$. EOF: normal..... 36

Figura 15 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções padrão de ARG e IBU e suas respectivas curvas de calibração. Concentrações crescentes dos analitos: ARG (a – h: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 e $1000\mu\text{molL}^{-1}$) e IBU (a – h: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 e $1000\mu\text{molL}^{-1}$). BGE: Ácido bórico 20 mmolL^{-1} ajustado para $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0\text{ s}$; Potencial de separação: $+25\text{ kV}$ (lado da injeção). EOF: normal..... 37

Figura 16 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão e amostra de ARG e IBU. Concentrações dos analitos: $500\mu\text{molL}^{-1}$ de ARG e $500\mu\text{molL}^{-1}$ de IBU. BGE: Ácido bórico 20 mmolL^{-1} ajustado para $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0\text{ s}$; Potencial de separação: $+25\text{ kV}$ (lado da injeção). EOF: normal..... 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação de reagentes e empresas onde foram adquiridos.....	26
Tabela 2 -	Características analíticas do método proposto.....	38
Tabela 3 -	Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de ARG e IBU por CE-C ⁴ D.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG	Arginina
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> ”)
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> ”)
HIS	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “ <i>High-performance liquid chromatography</i> ”)
IBU	Ibuprofeno
LC	Cromatografia Líquida (do inglês “ <i>Liquid cromatography</i> ”)
MÊS	Ácido 2-(N-morfolino) ethanosulfônico
TAPS	3[[2-Hidroxi-1,1bis (hidroximetil)etil] amino]-1-propanossulfônico

LISTA DE EQUAÇÕES

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

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Breve histórico	13
1.2	Abordagem teórica	14
1.2.1	<i>O conceito de mobilidade efetiva</i>	14
1.2.2	<i>Fluxo eletrosmótico (EOF)</i>	15
1.3	Eletroforese capilar de zona (CZE)	17
1.4	Determinação simultânea de cátions e ânions	18
1.5	Sistemas de detecção em CE	19
1.5.1	<i>Detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C⁴D)</i>	19
1.6	Análises rápidas por CE	21
1.7	Espécies estudadas	21
1.7.1	<i>Arginina</i>	21
1.7.2	<i>Ibuprofeno</i>	22
1.8	Formulações farmacêuticas estudadas	23
2	OBJETIVO	25
3	PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1	Reagentes e amostras	26
3.2	Instrumentação	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico

Grandes avanços tecnológicos têm sido realizados ao longo dos anos, no campo da ciência das separações, inclusive nas suas aplicações e instrumentações. Na década de 80 foi implementada mais uma técnica de separação, a eletroforese capilar (CE, do inglês “*capillary electrophoresis*”) que junto com a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) ampliaram a ciência das separações (TAVARES, 1997).

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de moléculas ou espécies carregadas quando submetidas a um campo elétrico (HEIGER, 1997). Arne Wilhelm Kansin 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 técnica apresentou como limitação o efeito Joule, que é caracterizado pelo aquecimento da solução devido à falta de capacidade de dissipar o calor provocado pela passagem de corrente elétrica por meio de um material de baixa resistividade (KNOX; MCCORMACK 1994).

A eletroforese teve uma grande contribuição nos anos 80, devido aos trabalhos de Jorgenson e Lukacs (JORGENSON; LUKACS, 1981; JORGENSON; LUKACS, 1983), que utilizaram capilares de sílica fundida. Devido ao pequeno diâmetro do capilar, na ordem de micrometros, o efeito Joule que interferia na eficiência da técnica, praticamente deixou de existir. Isso porque os capilares possuíam diâmetro interno bem reduzidos, levando à diminuição da área superficial interna do capilar e do volume de solução favorecendo a dissipação de calor. Desta forma foi possível a aplicação de campos elétricos mais elevados, o que levou à diminuição dos tempos de análise e gerou maior eficiência de separação.

A eletroforese capilar, é uma técnica de separação alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em análises de compostos farmacêuticos (KUBAN; HAUSER, 2008), que se destaca por apresentar alta

aplicabilidade, simplicidade e por abranger desde íons inorgânicos até macromoléculas (CUNHA, 2013). Como vantagens a CE apresenta:

- Baixos tempo de análise;
- Versatilidade, pois o mesmo capilar pode ser utilizado para diversos tipos de análises, apenas trocando a composição da solução tampão (BGE);
- Baixo custo de equipamento e manutenção; baixo consumo de reagentes e amostras quando comparado com a HPLC, o que reduz o custo da análise e de resíduos, pois em geral não é preciso um pré-tratamento da amostra (MARRA, 2014).

A técnica também apresenta algumas limitações, como:

- Compostos voláteis, não polares e de massa molar baixa, não são determinados adequadamente por CE, sendo melhor a utilização de GC para esses compostos;
- Para os polímeros não iônicos com alta massa molar é indicado o uso do HPLC, pois é mais sensível que a CE, sendo capaz de identificar espécies em níveis de traços (QUEIROZ; JARDIM, 2001);
- Dependência do valor de pH do BGE: Necessidade de um tampão estável (CUNHA 2013).

1.2 Abordagem teórica

Os fundamentos teóricos que serão abordados, são referentes a eletroforese capilar de zona (CZE), com capilares de sílica fundida (RIBEIRO, 2017), que é utilizado neste trabalho.

1.2.1 O conceito de mobilidade efetiva

A migração de eletrólitos fracos é descrita pelo conceito de mobilidade efetiva. Por meio da definição clássica de Tiselius pode-se calcular a mobilidade efetiva (μ_{ef}), na qual qualquer substância (i) presente em solução em diferentes formas (j) estão relacionadas entre si por um equilíbrio ácido base rápido e

ocorrerá migração como um soluto único, devido a um campo elétrico, possuindo assim uma mobilidade efetiva, onde α é a fração molar (TAVARES, 1996):

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

A velocidade eletroforética efetiva (v_{ef}) é obtida com a aplicação de um potencial E:

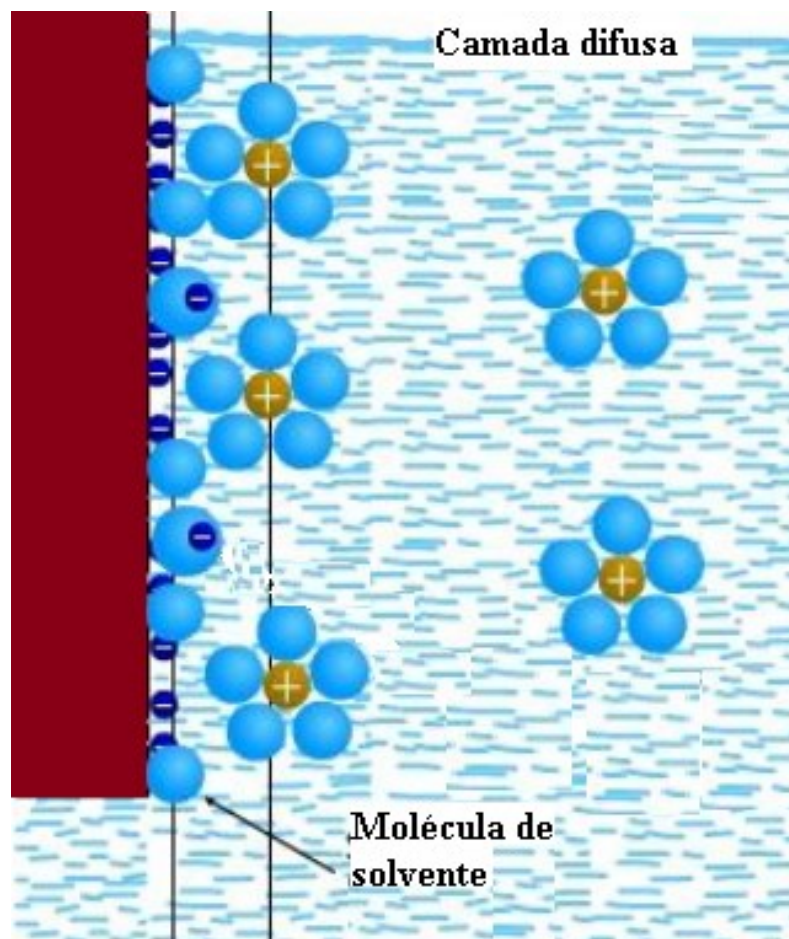
$$\text{Equação 2: } v_{ef} = \mu_{ef} \times E$$

A magnitude das constantes de dissociação do soluto (pKa) são dependentes das funções de distribuição, a equação 2 indica uma dependência indireta entre a mobilidade efetiva e o pH do meio. A mobilidade efetiva e a velocidade eletroforética específica são conceitos importantes, pois a separação entre espécies com mobilidades eletroforéticas é possível por meio da modificação da fração molar pela escolha do pH do BGE adequado (RIBEIRO, 2017).

1.2.2 Fluxo eletrosmótico (EOF)

O movimento dos íons em direção aos eletrodos de carga oposta, é devido a uma corrente que é gerada no interior do capilar, durante a aplicação de um campo elétrico elevado. O fenômeno de dupla camada elétrica que ocorre nas separações em CE, gera um fluxo eletrosmótico (BARD; FAULKNER, 1980; BAKER, 1995). Os íons adsorvem na superfície ionizada do capilar e formando a dupla camada elétrica, representada na figura 1.

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

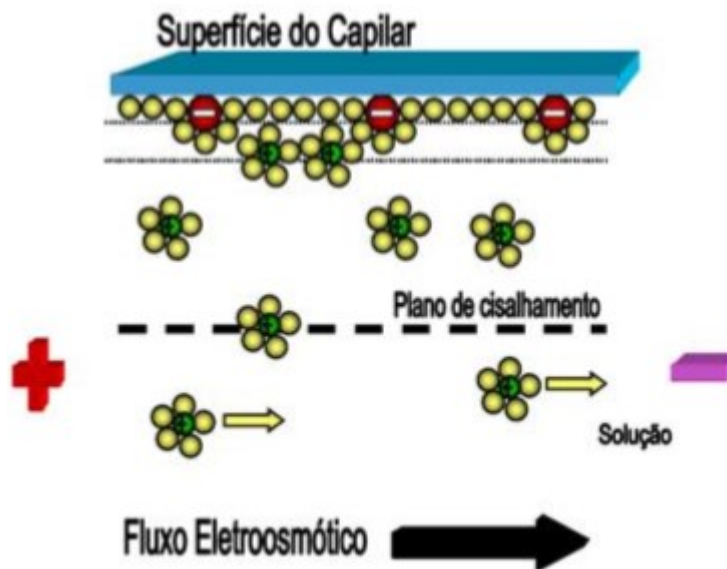


Fonte: Adaptado de DISCIPLINAS USP.

O deslocamento dos cátions, ânions e até de substâncias neutras, que não são atraídas pelos polos, em direção ao detector, acontece devido o fenômeno eletroforético do EOF que é capaz de provocar um fluxo de solução dentro da coluna capilar, arrastando os analitos (TAVARES, 1996).

Com a aplicação de um campo elétrico longitudinal, aliado com um diâmetro interno do capilar na ordem de micrometros, os íons do BGE envolvidos na formação da dupla camada elétrica, inicia um processo de migração para os polos de carga oposta. O EOF é a migração dos íons, estes transportam moléculas de água, o que induz um fluxo de solução como um todo. As cargas que estão mais próximas da parede do capilar não sofrem migração, mas as cargas positivas da camada difusa, que é caracterizada como o plano de cisalhamento, são arrastadas em direção ao cátodo (polo negativo) e esse fluxo é denominado de EOF normal (RIBEIRO, 2017), representado na figura 2.

Figura 2 – Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.



Fonte: MARRA,2014.

Dessa maneira, a migração dos cátions é maior que dos ânions, porque a mobilidade do cátion se soma a mobilidade do fluxo, em direção ao cátodo. Já os ânions têm uma migração menor, porque tendem a ser atraídos em direção ao ânodo, indo contra o sentido fluxo.

Em alguns casos, quando a mobilidade eletroforética do ânion é elevada, pode-se fazer a inversão do EOF, que consiste na adição de tensoativos catiônicos ao BGE (KANETA; TANAKA; TAGA, 1993; LUCY, 1996; TAVARES, 1997).

A velocidade do EOF pode ser afetada por alguns fatores como, por exemplo, o campo elétrico, quanto maior o potencial aplicado maior será a velocidade de migração do EOF (HEIGER, 1997).

1.3 Eletroforese capilar de zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona ou eletroforese capilar em solução livre, utilizada nesse trabalho, é um dos métodos de separação mais realizados na prática, devido a sua simplicidade e sua fácil implementação (RIBEIRO, 2017). Neste tipo de eletroforese, a separação ocorre em capilar preenchido com um

eletrólito, normalmente com caráter tamponante. As zonas distintas que são formadas ao longo do capilar são devidas as diferenças de mobilidades dos analitos presentes (MCGUFFIN; TAVARES, 1997; TAVARES; MCGUFFIN, 1994).

A grande vantagem da CZE é a possibilidade de determinação simultânea de cátions e ânions. Com a aplicação de um potencial de separação, cada zona migra de maneira independente, com velocidade constante, porém diferenciada, resultante da mobilidade característica de cada analito (TAVARES, 1997).

1.4 Determinação simultânea de cátions e ânions

A determinação simultânea de compostos iônicos é de grande interesse industrial, principalmente na área farmacêutica, pois a maioria dos princípios ativos são produzidos na forma de sais (PAULEKUHN; DRESSMAN; SAAL, 2007). O fluxo eletrosmótico tem grande importância na determinação simultânea de cátions e ânions. O EOF é responsável pela condução de solutos até o detector, o que torna a análise simultânea possível (KOENKA et al, 2016) (WEEKLEY; FOLEY, 2007).

Os analitos catiônicos e aniônicos podem ser movidos na mesma direção, quando usado um EOF de alta velocidade de migração ($\text{pH} > 7$), assim os íons lentos serão arrastados pelo fluxo até o detector (JOHNS et al., 2004). Existem também outras maneiras para que possa ser feita a análise simultânea, como a complexação de espécies catiônicas com uma substância quelante, porém esta é mais complicada que a primeira. A outra maneira é uma injeção dupla da amostra, no qual os ânions são injetados no polo negativo (cátodo) e migram no sentido contrário do EOF e os cátions são injetados no polo positivo (ânodo) e migram no mesmo sentido do EOF (WEEKLEY; FOLEY, 2007; TOMOYOSHI; ROSS, 1999; SARAZIN et al, 2010; KROKHIN et al, 1997).

A determinação simultânea de cátions e ânions muitas vezes é realizada por HPLC, porém a técnica exige instrumentação complexa, injetores duplos e, muitas das vezes, mais de um tipo de eluente/coluna, tornando o custo da análise mais alto (SAARINORDHAUS; ANDERSON, 1991).

1.5 Sistemas de detecção em CE

O sistema de detecção em CE é muito importante para a técnica, não basta apenas um bom sistema de separação, o detector tem papel fundamental (MARRA, 2014). Existem vários tipos de detectores e cada um com suas peculiaridades, um pode apresentar maior seletividade, enquanto o outro apresenta uma faixa linear de resposta melhor. O ideal é que o sistema de detecção seja o mais seletivo e sensível possível aos analitos de interesse (RIBEIRO, 2017).

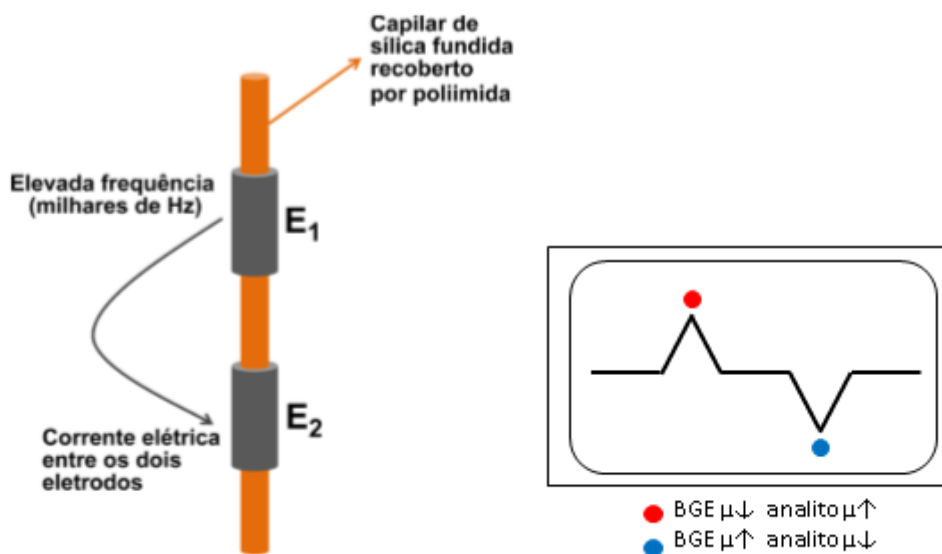
Os sistemas de detecção são classificados em: métodos ópticos, eletroquímicos e acoplados (DA SILVA, 2003). Os métodos ópticos são absorção de luz na região do ultravioleta-visível ou infravermelho, fluorescência, índice de refração, entre outros. Os métodos eletroquímicos são amperométricos, voltamétricos, condutométricos e potenciométricos. Os métodos acoplados correspondem a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas, por exemplo. A maioria dos sistemas de detecção são aplicados em outras técnicas de separação e foram adaptados para CE, muitos são semelhantes aos usados em HPLC (MARRA, 2014).

1.5.1 Detecção condutométrica sem contato acoplado capacitivamente (C^4D)

No ano de 1998, pesquisadores descreveram simultânea e independentemente a detecção condutométrica sem contato capacitivamente acoplada (C^4D , do inglês *capacitively coupled contactless conductometry detection*) (ZEMANN et al., 1998; DA SILVA; DO LAGO, 1998). Esse sistema de detecção permitiu com que não houvesse a necessidade de perfuração do capilar com laser de CO_2 , como os habituais detectores condutométricos convencionais, que há a necessidade de contato. Dessa maneira, o detector é acoplado na parte externa do capilar (HUANG et al., 1987; HUANG et al., 1991; HUANG; ZARE, 1991), preservando o recobrimento de poliimida do capilar.

Na figura 3, pode ser observada a detecção C^4D , baseada no acoplamento de dois eletrodos tubulares metálicos externos ao capilar de sílica fundida (DA SILVA; DO LAGO, 1998).

Figura 3 - Esquema do sistema de detecção C^4D e representação de um eletroferograma com pico positivo e pico negativo. E1 e E2 são os dois eletrodos do sistema de detecção.



Fonte: (RIBEIRO, 2017).

No detector é aplicado um sinal senoidal de alta frequência, da ordem milhares de Hz, em um dos eletrodos. As espécies iônicas do eletrólito e da amostra permitem a passagem de uma corrente elétrica proporcional à condutividade até o outro eletrodo e, posteriormente, esta corrente gerada é conduzida ao dispositivo de registro por meio de uma interface (DA SILVA; DO LAGO, 1998; DA SILVA; DO LAGO, 2000; BRITO-NETO; DA SILVA; BLANES; DO LAGO, 2005).

A resposta obtida pelo detector é dada pela substituição do co-íon presente no eletrólito pelo analito. Quando o analito apresenta maior mobilidade que o co-íon do eletrólito a condutividade aumenta nessa região, então um sinal positivo é registrado. Ao contrário, se o analito apresenta menor mobilidade de o co-íon do eletrólito, o sinal registrado é negativo (MARRA, 2014).

A C^4D tem chamado atenção, por ser um detector sem a possibilidade de contaminação, devido ao seu posicionamento externo e também a facilidade de posicionar os eletrodos (DA SILVA; DO LAGO, 1998).

1.6 Análises rápidas por CE

A CE permite análises com alta eficiência de separação em um curto período de tempo (na ordem de segundos), o que permite o desenvolvimento de um método rápido de análise. Para isso são necessárias algumas estratégias, como a utilização de capilares com comprimento reduzido (OPEKAR; COUFAL; STULIK, 2009) ou até mesmo a utilização de vários capilares no mesmo instrumento (MARSH; ALTRIA, 2006).

1.7 Espécies estudadas

Duas espécies diferentes foram objetos de estudo: Arginina e o ibuprofeno, que estão associadas em um medicamento. A associação de mais de um princípio ativo em medicamentos é muito comum na indústria farmacêutica. O ibuprofeno é um anti-inflamatório e que aliado à arginina, que é um aminoácido natural do nosso organismo, promove o fortalecimento do sistema imunológico (ANVISA, 2010). O IBU na presença de ARG adquire propriedades distintas, como o aumento de sua solubilidade, já que este, por si só, é insolúvel em água. Com o aumento da solubilidade, acelera-se a absorção do medicamento no tubo digestivo e sua passagem para o sangue, melhorando a sua biodisponibilidade. A principal diferença entre o IBU e o IBU + ARG é que este último acelera o metabolismo, fazendo com que o efeito seja em um período mais curto, gerando uma melhora mais rápida ao paciente.

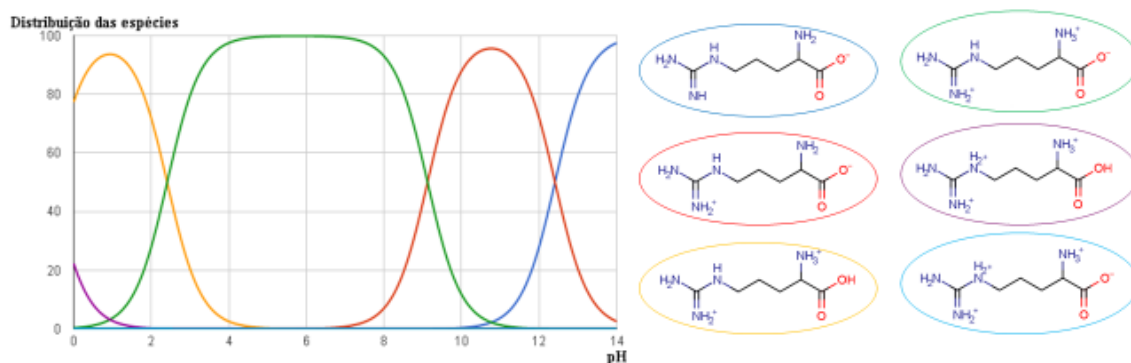
1.7.1 Arginina

A arginina (ARG) ou ácido 2-amino-5-carbamimidamidopentanóico, é um aminoácido importante na síntese de proteínas e também participa no ciclo da ureia em humanos e animais (VIANA, 2010). É facilmente solúvel em água, apresenta ponto de fusão elevado, no valor de 238°C, possui massa molar de 174,20 g.mol⁻¹ e fórmula molecular C₆H₁₄N₄O₂ (SWAIN, 2018).

A ARG é utilizada no auxílio ao sistema imunológico e na cicatrização de feridas. Ela também é usada em dietas como suplemento para ganho de massa magra, pois favorece a síntese de proteínas, estimulando o crescimento de

estruturas musculares (BARBOSA, 2010). A ARG possui três diferentes pK_a 's, $pK_{a1}= 2,41$, $pK_{a2}= 9,09$ e $pK_{a3}= 12,41$ e se comporta como ácido ou como base, ou seja, é uma molécula anfótera. A distribuição das espécies da ARG está representada na figura 4.

Figura 4 – Diagrama de distribuição das espécies vs pH para a arginina (ARG) e suas respectivas espécies.



Fonte: www.chemicalize.org.

1.7.2 Ibuprofeno

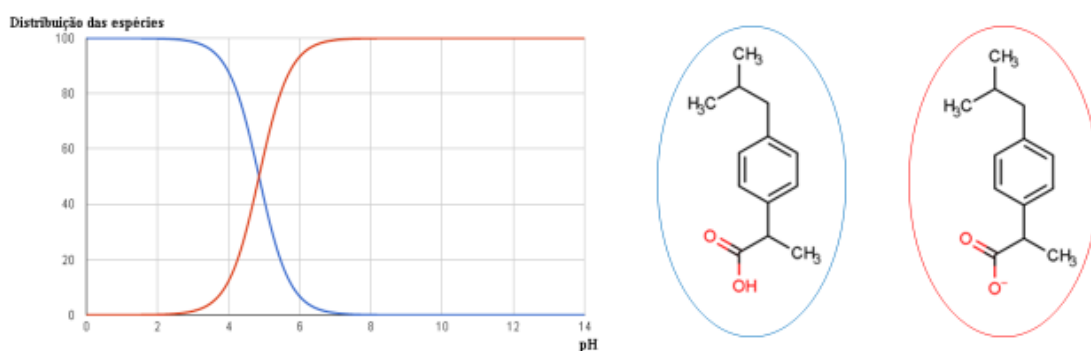
O ibuprofeno (IBU) ou (R,S)-ácido α -metil-4-(2-metilpropil)benzenoacético, que é um pó de aparência branca cristalina e de odor característico é derivado do ácido propanóico. Apresenta baixíssima solubilidade em água, mas é facilmente solúvel em solventes orgânicos como etanol, clorofórmio e acetona. Seu ponto de fusão é de aproximadamente 76°C, possui massa molar de 206,27 g.mol⁻¹ e é um hidrocarboneto de fórmula molecular C₁₃H₁₈O₂ (ANVISA, 2010).

O IBU é um fármaco do grupo dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), com ação antitérmica, analgésica e anti-inflamatória moderada (ADAMS; BRESLOFF; MASON, 1976). Pode ser utilizado para o alívio de sintomas de enxaquecas, cólicas menstruais, dores musculares, febre e quadros inflamatórios como artrite reumatoide (MACDONALD; WEI, 2003). A OMS (Organização Mundial da Saúde) considera o IBU uma medicação essencial.

Apesar da gama variada de anti-inflamatórios presentes no mercado, o IBU é o que menos provoca reações secundárias como hemorragia gastrointestinal e também apresenta ação mais longa que o ácido acetilsalicílico (ADAMS; BRESLOFF; MASON, 1976).

O IBU apresenta um $pK_a = 4,85$ e comportamento de um ácido fraco. Em pH neutro todas as suas moléculas apresentam forma aniônica (carga negativa) (SWAIN, 2018). A figura 5, mostra esse comportamento.

Figura 5 – Diagrama de distribuição das espécies vs pH para o ibuprofeno (IBU) e suas respectivas espécies.



Fonte: www.chemicalize.org.

1.8 Formulações farmacêuticas estudadas

É comum princípios ativos estarem associados em uma única formulação farmacêutica devido ao efeito sinérgico que pode ser obtido. O efeito sinérgico é a potencialização de uma substância química pela associação de outro princípio ativo (RAFFA; STONE; TALLARIDA, 2000).

O IBU e a ARG estão associados em um único medicamento devido aos efeitos sinérgicos. Essa associação resulta em um medicamento de rápida absorção pelo organismo, projetado para promover um início de analgesia mais rápido do que as formas comercialmente disponíveis de IBU. O desenvolvimento de metodologias que possibilitem determinações simultâneas a um custo menor e com a manutenção da qualidade dos resultados são de grande importância para a análise dessas formulações que possuem mais de um princípio ativo em sua composição (HUIDOBRO; PUPÉREZ; BARBAS, 2005).

Na literatura foi encontrado apenas um trabalho que faz a determinação simultânea de IBU e ARG por HPLC, em vinte minutos, neste trabalho é necessário a combinação de duas fases estacionárias diferentes (HUIDOBRO; PUPÉREZ; BARBAS, 2005). O desenvolvimento de um método que faz a determinação simultânea de IBU e ARG em poucos segundos, que é o objetivo deste trabalho, pode permitir que empresas com menor poder aquisitivo implementem a metodologia desenvolvida para o controle de qualidade da formulação farmacêutica, pois os custos de aquisição, de operação e de manutenção são consideravelmente inferiores se comparada por exemplo, com a HPLC que é uma técnica de separação amplamente utilizada.

2. OBJETIVO

Desenvolver um método simples e rápido para a determinação simultânea de ibuprofeno e arginina em amostras farmacêuticas utilizando como técnica a eletroforese capilar com detecção C⁴D.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados neste estudo são de grau analítico e por isso foram usados sem purificação prévia. Água deionizada (18 MQ cm^{-1}), utilizada foi obtida a partir de um sistema de purificação denominado Direct-Q-System (Millipore, Bedford, MA). A relação dos reagentes utilizados encontra-se na tabela 1:

Tabela 1 - Relação de reagentes e empresas onde foram adquiridos.

Reagentes	Empresas
ácido[(2-hidroxi-1,1bis(hidroximetil)etil)amino]-1-propanosulfônico (TAPS)	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
NaOH	Dinâmica (Diadema, Brasil)
H ₃ BO ₃	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
Ácido 2-(morfolin-4-il)etano-1-sulfônico (MES)	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Histidina (HIS)	Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
Etanol	Synth (Diadema - Brazil)
Arginina (ARG)	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
Ibuprofeno (IBU)	Sigma Aldrich (St. Louis, United States)
Spidufen	Mercado local

A preparação da solução estoque de ARG foi feita em água deionizada para uma concentração de 10mmolL^{-1} . Para a preparação da solução estoque de 5mmolL^{-1} de IBU foi necessário a adição de 10% de etanol para completa dissolução. Para a preparação da amostra também foi necessário 10% de etanol para total solubilização do sal. Tanto os padrões como a amostra foram mantidas no ultrassom até total solubilização, por cerca de 10 minutos.

Para o estudo do BGE foram preparadas diferentes soluções com diferentes valores de pH. O BGE utilizado nas análises era composto de H_3BO_3 (20mmolL^{-1}) e NaOH para $\text{pH}=8,0$.

3.2 Instrumentação

Foi utilizado um equipamento de CE construído no laboratório do Professor Caludimir Lúcio do Lago, do Instituto de Química da USP. O equipamento possui dois detectores condutométricos compactos sem contato e de alta resolução acoplados capacitivamente (C^4D) (DA SILVA; DO LAGO, 1998; MENDONÇA; DO LAGO, 2009). A versão utilizada de C^4D não possui partes móveis, como potenciômetros e conectores, sendo desta maneira considerado um detector compacto e robusto (MENDONÇA, K.J. F.; DO LAGO, C.L., 2009). O controle do equipamento é feito por meio de um programa de computador. O equipamento descrito está ilustrado na figura 6.

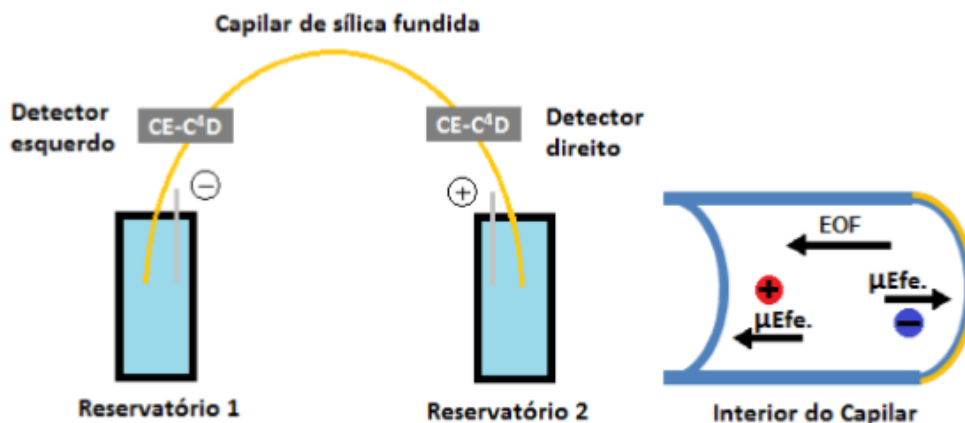
Figura 6 - Equipamento de CE- C^4D utilizado neste experimento



Fonte: MARRA, 2014.

O sistema CE-C⁴D utilizado para este experimento está esquematizado na figura 7.

Figura 7 - Esquema do sistema de CE-C⁴D



Fonte: MARRA, 2014.

As injeções foram realizadas hidrodinamicamente (pressão positiva) no lado direito do equipamento (ânodo). Os detectores estavam posicionados ao longo do capilar a 10 cm de cada extremidade. O capilar de sílica fundida utilizado em todas as análises tinha em torno de 50 cm de comprimento total, 50μm de diâmetro interno e de 375μm de diâmetro externo (Agilent, Folsom, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados usando o primeiro detector.

Antes de cada análise, o capilar era previamente condicionado por lavagem com NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 15 minutos, seguido de 10 minutos de água deionizada e por último, 10 minutos com o BGE e ser utilizado nos experimentos. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente por 1,0s a uma pressão de 25kPa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

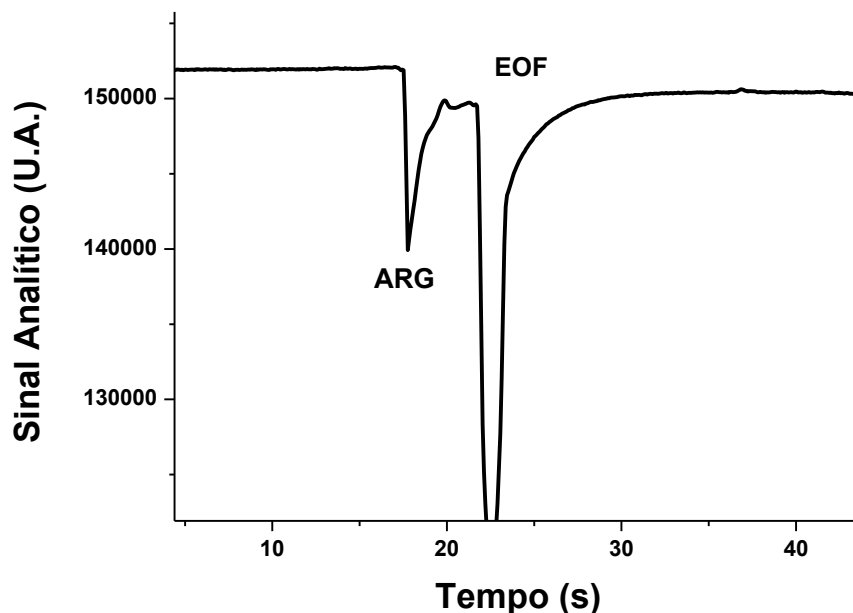
De acordo com a literatura (SWAIN, 2018) o IBU apresenta um único valor de pKa de 4,85, enquanto ARG apresenta valores de pKa 2,41; 9,09 e 12,41.

As curvas de distribuição sugerem que entre os valores de pH de 7,8 - 8,6, tanto o IBU e ARG possuem cargas. Nesta faixa de pH o IBU encontra-se na forma aniônica e a ARG na forma catiônica, o que torna possível e favorável a determinação simultânea.

Quando a molécula está carregada negativamente, IBU, o sinal analítico sairá depois do EOF. Quando carregada positivamente, ARG, o pico sairá antes do EOF. Isso porque o cátion migra mais rapidamente que o EOF, devido a atração com o polo negativo do eletrodo, e desta forma suas velocidades são somadas. O ânion por possuir repulsão ao polo negativo (direção do EOF), tem sua velocidade eletroforética subtraída à do EOF e por isso move-se de forma mais lenta com relação ao EOF e aos cátions.

O primeiro BGE testado era composto por TAPS (20mmolL⁻¹) com NaOH em pH = 8. Como mostra a figura 8, foi obtido sinal para ARG, mas o IBU não apresentou sinal.

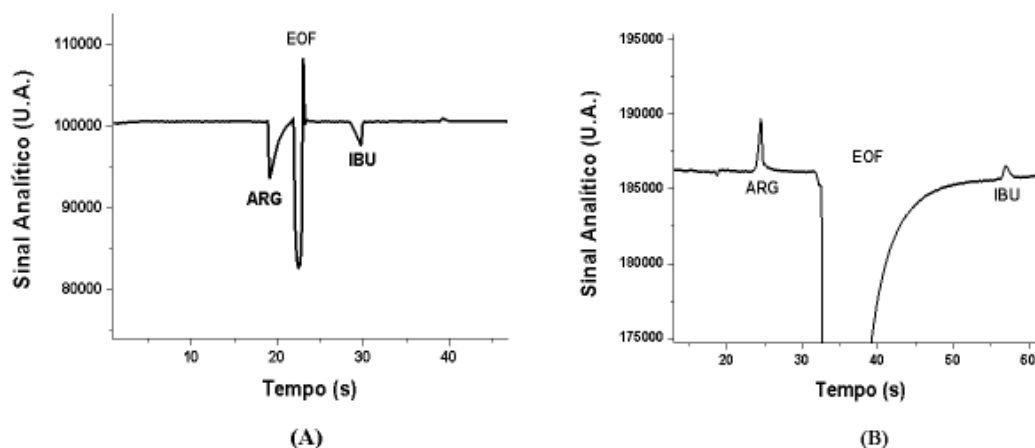
Figura 8 - Eletroferograma obtido utilizando BGE TAPS (20mmolL^{-1}) ajustado para $\text{pH} = 8,0$ com NaOH. Concentração de ambos os analitos: $500\mu\text{molL}^{-1}$. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por 1,0s. Potencial de separação: +25kV (lado da injeção). EOF: normal.



Fonte: O Autor.

Outras composições de BGE foram utilizadas a fim de obter sinal analítico para ambos os compostos de interesse. Foi utilizado um BGE composto por 20mmolL^{-1} de H_3BO_3 com NaOH até $\text{pH} = 8,0$ (A) e outro BGE composto por 30mmolL^{-1} de MES e HIS $\text{pH} = 6,0$ (B) como apresentado na figura 9.

Figura 9 - Eletroferogramas obtidos utilizando: (A) BGE ácido bórico (20mmolL^{-1}) ajustado com NaOH até $\text{pH} = 8,0$. (B) BGE composto por 30mmolL^{-1} de MES e HIS $\text{pH} = 6,0$. Concentração de ambos os analitos: $500\mu\text{molL}^{-1}$. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por $1,0\text{s}$. Potencial de separação: $+25\text{kV}$ (lado da injeção). EOF: normal.



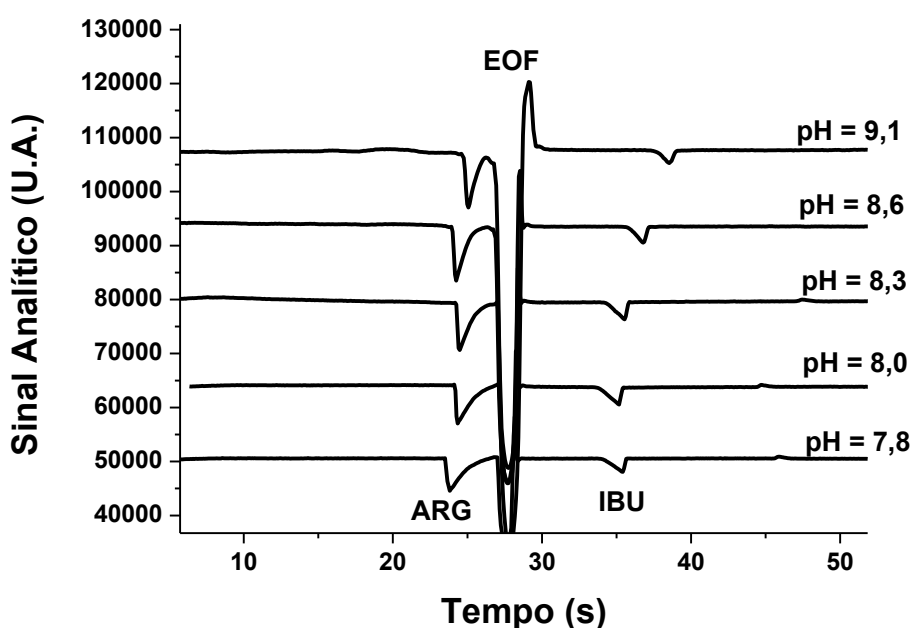
Fonte: O Autor.

Devido ao pH mais baixo do BGE composto por MES e HIS a velocidade de migração do EOF é mais lenta devido aos grupos silanóis, presentes na parede do capilar de sílica fundida estarem pouco ionizados (EOF com baixa mobilidade). Com o BGE ácido bórico em $\text{pH} = 8$ quase 100% dos grupos silanóis estão ionizados, o que aumenta a mobilidade do EOF e torna a análise mais rápida. Nesta condição, cátions irão migrar rapidamente em direção do detector (EOF normal + mobilidade eletroforética) e ânions com mobilidade eletroforética reduzida serão levados até o detector pelo EOF (mobilidade do EOF $\gg$ mobilidade eletroforética). Desta forma, os cátions (ARG) serão detectados antes do EOF e os ânions (IBU) detectados imediatamente após o pico do EOF (água + moléculas neutras).

O BGE composto por H_3BO_3 tem tempo de análise total de aproximadamente 30s, enquanto o BGE composto por MES-HIS dura cerca de 60s. Por isso, o BGE composto por H_3BO_3 foi utilizado para a determinação da ARG e IBU.

Posteriormente, foi feito um estudo da faixa de pH ideal utilizando o BGE composto por 20mmolL^{-1} de ácido bórico e ajustado com hidróxido de sódio. O eletroferograma está representado na figura 10.

Figura 10 - Efeito da variação de pH, com BGE ácido bórico 20mmolL^{-1} ajustado com NaOH, utilizando padrões de ARG e IBU por CZE. Com concentrações dos analitos de $500\mu\text{molL}^{-1}$ de ambas as espécies. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por $1,0\text{s}$. Potencial de separação: $+25\text{kV}$ (lado da injeção). EOF: normal.

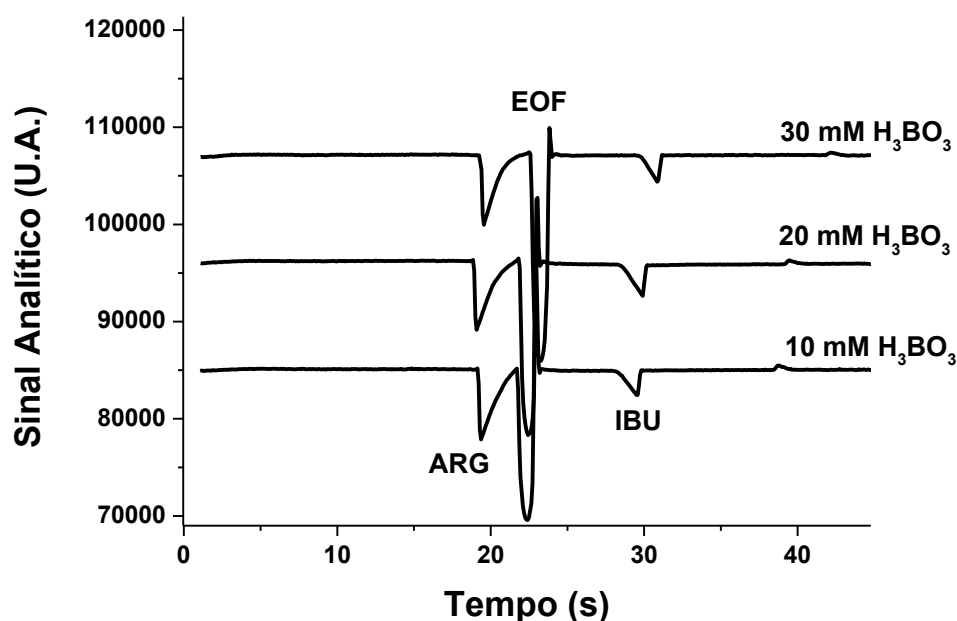


Fonte: O Autor.

Com o aumento do pH as moléculas de ARG tendem a desprotonar, perdendo a carga positiva, como mostrado na distribuição das espécies na figura 4, ficando parte das moléculas com mobilidade zero e por isso os picos aparecem mais próximos do EOF. Já o IBU em valores de pH acima de 7,8 quase 100% das espécies estão na forma aniônica e por isso, quase não sofrem influência do pH. Foi selecionado o pH = 8,0 para as análises posteriores, porém a análise poderia ser feita em toda a faixa de pH, o que torna a análise bastante robusta já que não há tanta necessidade de um controle rigoroso dos valores de pH.

Em seguida foi estudado a concentração de ácido bórico no BGE, figura 11.

Figura 11 - Estudo da composição do BGE utilizando uma solução padrão de $500\mu\text{molL}^{-1}$ ARG e IBU. BGE: 10, 20 e 30mmolL^{-1} de ácido bórico ajustado em $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por $1,0\text{s}$; Potencial de separação: $+25\text{kV}$ (lado da injeção). EOF: normal.

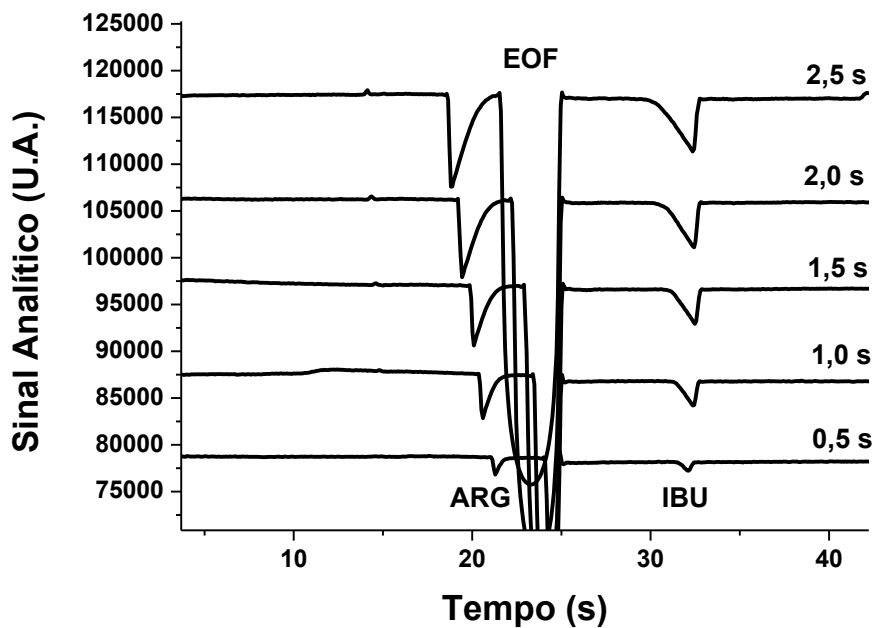


Fonte: O Autor.

Observou-se que a concentração não influenciou no tempo de análise e na separação dos analitos, com isso foi escolhido a concentração de 20mmolL^{-1} como padrão para os demais testes, por ser uma concentração intermediária, porém, qualquer uma das concentrações poderia ser utilizada.

Em seguida foi feito o estudo para definição do melhor tempo de injeção. No intervalo de 0,5 a 2,5s (figura 12), o tempo de injeção de 1s foi selecionado para os demais estudos, pois apresentou boa resolução entre os picos mesmo com o aumento da concentração da ARG.

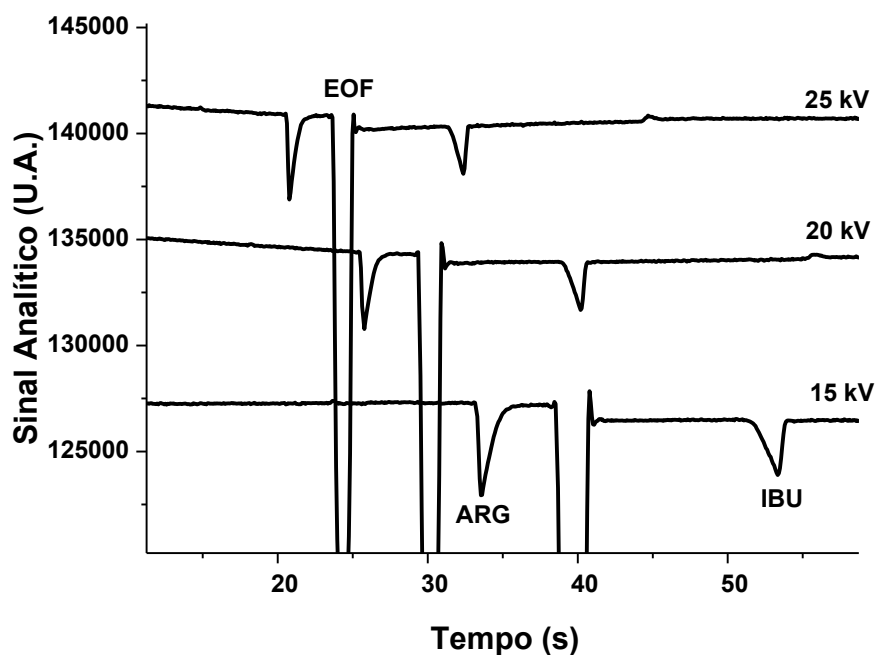
Figura 12 - Estudo do tempo de injeção de uma solução padrão de $500\mu\text{molL}^{-1}$ ARG e IBU. BGE: 20 mmolL^{-1} de ácido bórico ajustado em $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25kPa variando de $0,5 - 2,5\text{s}$; Potencial de separação: $+25\text{kV}$ (lado da injeção). EOF: normal.



Fonte: O Autor.

Foi feito também o estudo para definição do melhor potencial a ser aplicado. No intervalo de 15 a 25kV (figura 13), o potencial de 25kV foi selecionado para as análises, pois apresentou menor tempo de análise.

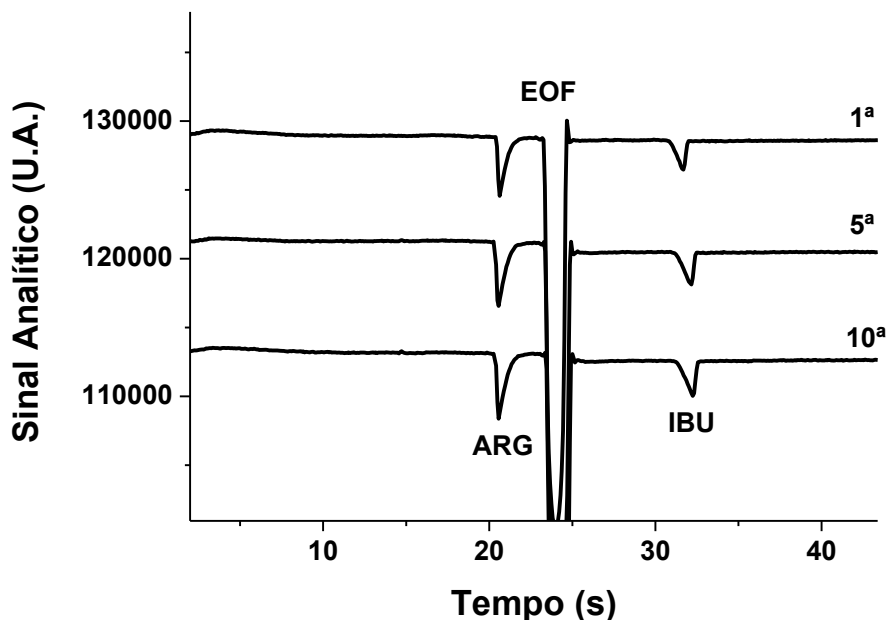
Figura 13 - Estudo da aplicação de potencial em uma solução padrão de $500\mu\text{molL}^{-1}$ ARG e IBU. BGE: 20mmolL^{-1} de ácido bórico ajustado em $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25kPa variando de $15 - 25\text{kV}$; Tempo de injeção: $1,0\text{s}$. EOF: normal.



Fonte: O Autor.

Após a avaliação das melhores condições dos parâmetros procedeu-se com o estudo de repetibilidade para checar a estabilidade do sistema. O desempenho do sistema é mostrado na figura 14 com o primeiro, quinto e décimo eletroferogramas obtidos a partir da injeção de uma solução padrão contendo ARG ($500\mu\text{molL}^{-1}$) e IBU ($500\mu\text{molL}^{-1}$). Os desvios calculados a partir dos eletroferogramas (figura 14) estão apresentados na tabela 2.

Figura 14 - Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas da mesma solução padrão contendo ARG ($500\mu\text{ molL}^{-1}$) e IBU ($500\mu\text{ molL}^{-1}$). BGE: 20 mmolL^{-1} de ácido bórico ajustado em $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25 kPa por $1,0\text{ s}$. Potencial de separação: $+25\text{ kV}$. EOF: normal.

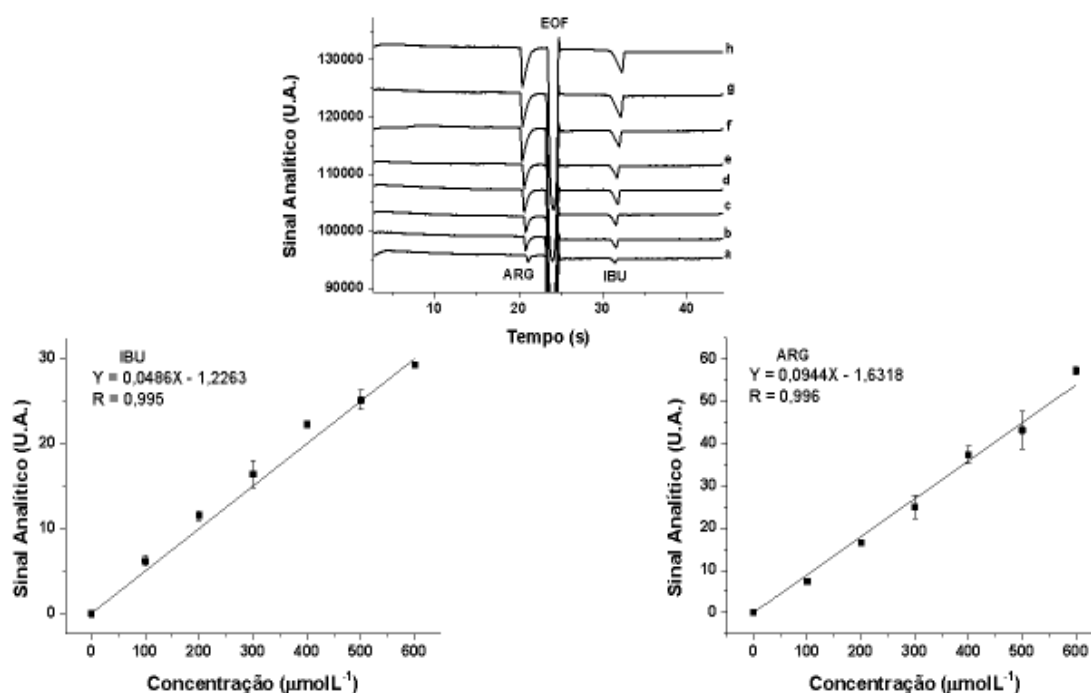


Fonte: O Autor.

Este estudo mostrou que o método proposto apresenta boa estabilidade, com desvios padrões relativos inferiores a 4,64 e 0,82% em relação à área e tempo de migração, respectivamente (tabela 2). Isto mostra que não há necessidade da renovação do BGE no capilar ao longo de dez análises sucessivas.

Para avaliar a faixa linear de resposta do método foram feitas injeções de concentrações crescentes com padrões contendo ARG e IBU (Figura 15). Uma faixa menos ampla de concentração (a - f) foi selecionada para construir as curvas de calibração e apresentam coeficientes de correlação iguais a 0,996 e 0,995 para ARG e IBU, respectivamente (figura 15).

Figura 15 - Eletroferogramas obtidos a partir de soluções padrão de ARG e IBU e suas respectivas curvas de calibração. Concentrações crescentes dos analitos: ARG (a – h: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 e 1000 μmolL^{-1}) e IBU (a – h: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 e 1000 μmolL^{-1}). BGE: Ácido bórico 20mmolL⁻¹ ajustado para pH = 8,0. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por 1,0s; Potencial de separação: +25kV (lado da injeção). EOF: normal.



Fonte: O Autor.

A tabela 2 apresenta todas as características analíticas do método. Dentre estas características estão o LOD e LOQ que foram calculados de forma empírica. Para a determinação dos valores de LOD foram feitas injeções dos analitos (ARG e IBU), utilizando concentrações cada vez mais baixas (diluição progressiva), até que não houvesse diferença do pico do analito com o ruído de fundo (ARMBRUSTER; TILLMAN; HUBBS, 1994; LAWSON, 1994).

Tabela 2 - Características analíticas do método proposto.

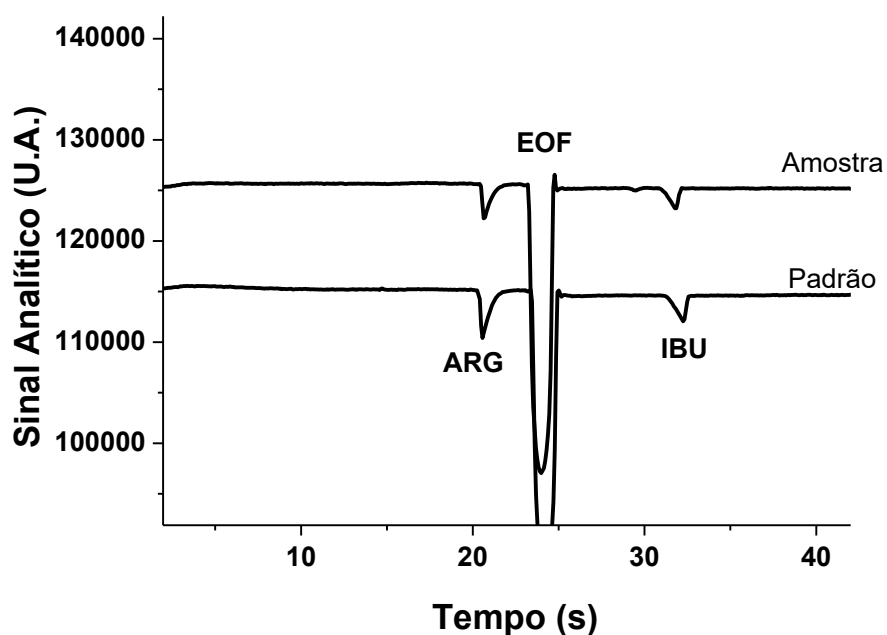
Características	ARG	IBU
Tempo de migração (s)	20,5 ± 0,1	32,1 ± 0,3
Resolução^a	2,45 ± 0,16	5,56 ± 0,04
Coeficiente de correlação	0,996	0,995
Faixa Linear (μmolL^{-1})	100 – 1000	100 – 1000
LOD (μmolL^{-1})	30	35
LOQ (μmolL^{-1})	99,9	116,55
Frequência analítica (h⁻¹)	112	112
Intra-dias DPR (n = 10)	3,58%	4,64%

^aResolução entre o pico correspondente e o anterior.

Os valores de limite de detecção são relativamente elevados, porém são adequados para o tipo de amostra analisada.

Na figura 16 apresenta os eletroferogramas de uma solução padrão e de uma solução amostra. O método proposto mostrou-se adequado para o controle de qualidade da formulação farmacêutica contendo ARG e IBU, pois não houve sobreposições ou picos adicionais provenientes de interferentes (excipientes, por exemplo).

Figura 16 - Eletroferogramas obtidos com a injeção de uma solução padrão e amostra de ARG e IBU. Concentrações dos analitos: $500\mu\text{molL}^{-1}$ de ARG e $500\mu\text{molL}^{-1}$ de IBU. BGE: Ácido bórico 20mmolL^{-1} ajustado para $\text{pH} = 8,0$. Injeção hidrodinâmica: 25kPa por 1,0s; Potencial de separação: +25kV (lado da injeção). EOF: normal.



Fonte: O Autor.

As curvas de calibração, apresentadas na figura 15, foram usadas para avaliar a exatidão do método CE- C^4D proposto mediante estudos de adição e recuperação para duas amostras (A1 e A2), tabela 3. Os estudos de adição e recuperação apresentaram excelentes resultados com recuperações 102% para ARG e 100,5% para IBU, indicando ausência de efeitos de matriz na amostra.

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de ARG e IBU por CE- C^4D .

	Amostra	Bula (mg por sachê)	CE (mg)
A1	ARG	555	$533,67 \pm 0,04$
	IBU	600	$607,98 \pm 0,01$
A2	ARG	555	$564,33 \pm 0,02$
	IBU	600	$648,79 \pm 0,08$

5. CONCLUSÃO

A CE-C⁴D foi usada com sucesso para o desenvolvimento de métodos para determinação rápida e simultânea dos princípios ativos IBU e ARG presentes na formulação farmacêutica. O método desenvolvido é simples, rápidos e de custo reduzido tanto em relação ao equipamento utilizado e ao consumo de reagentes, pois é um equipamento construído em laboratório e que exige um consumo muito pequeno de reagentes e amostras o que reduz os custos da análise e também os impactos ambientais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.; BRESLOFF, P.; MASON, C. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (—) isomer. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 256-257, 1976.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, v.e.E.B., 2010.
- ARMBRUSTER, D.A.; TILLMAN M. D.; HUBBS, L. M. Limit of detection (lod) limit of quantitation (loq) - comparison of the empirical and the statistical, methods exemplified with gc-ms assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1233-1238, 1994.
- BARBOSA, C. T. **Bases moleculares dos efeitos da suplementação crônica com arginina sobre a sensibilidade à insulina: Repercussões sobre os tecidos muscular esquelético, adiposo, hepático e sobre a secreção de insulina**. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- 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.; DA SILVA, J.A.F.; BLANES, L.; DO LAGO, C.L. Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 2. Peak shape, stray capacitance, noise, and actual electronics. **Electroanalysis**, v. 17, n. 13, p. 1207-1214, 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.
- 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. An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 20, p. 4339-4343, 1998.
- DA SILVA, J. A. F.; DO LAGO, C. L. Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. **Electrophoresis**, v. 21, n. 7, p. 1405-1408, 2000.

DISCIPLINAS USP. **Noções básicas de eletroquímica**. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3083350/mod_resource/content/1/Conceitos%20de%20eletroquimica.pdf> Acesso em: 19 fev. 2018.

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.

HUIDOBRO, L.A.; PUPÉREZ, J.F.; BARBAS, C. Tandem column for the simultaneous determination of arginine, ibuprofen and related impurities by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1119, n.2006, p.238–245, 2005.

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

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.

KNOX, J.H.; MCCORMACK, K.A. Temperature effects in capillary electrophoresis. 1: Internal capillary temperature and effect upon performance. **Chromatographia**, v. 38, n. 3, p. 207-214, 1994.

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

KROKHIN, O. V. et al. Use of cationic polymers for the simultaneous determination of inorganic anions and metal-4-(2-pyridylazo) resorcinolato chelates in kinetic differentiation-mode capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.776, n. 2, p. 329-336, 1997.

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.

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

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.

MACDONALD, T.; WEI, L. Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. **The Lancet**, v.361, n.9357, p. 573-574, 2003.

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.

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.

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.

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.

PAULEKUHN, G.S.; DRESSMAN, J.B.; SAAL, C. Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of de Orange Book Database. **Journal of Medicina Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 6666-6672, 2007.

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

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.

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.

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.

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

SWAIN, M. Software review. **Chemical Information Modeling**, 2018.

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.

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

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

VIANA, L. M. **Arginina no processo de translocação bacteriana: permeabilidade intestinal, vias de ação e resposta imunológica na obstrução intestinal induzida em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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.