

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
ALINE DE CAMARGO BILITARDO**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO  
ELETROFORÉTICO E DE  
ÁCIDO-BASE PARA ALGUNS COMPOSTOS DE INTERESSE  
VETERINÁRIO**

**Mogi das Cruzes, SP  
2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
ALINE DE CAMARGO BILITARDO**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO  
ELETROFORÉTICO E DE  
ÁCIDO-BASE PARA ALGUNS COMPOSTOS DE INTERESSE  
VETERINÁRIO**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação da  
Universidade de Mogi das Cruzes  
como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia na área de Exatas**

**Orientador: Prof. Dr. André Fernando de Oliveira**

**Mogi das Cruzes, SP  
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Abibi, Aline de Camargo Bilitardo

Contribuição para o estudo do comportamento eletroforetico e de ácido base para alguns compostos de interesse veterinário / Aline de Camargo Bilitardo Abibi. - 2007.

80 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2007

Área de concentração: Ciências Exatas

Orientador: Prof. Dr. André Fernando de Oliveira

1. Estreptomicina 2. Eletroforese capilar 3. Fluxo eletrosmótico I. Título II. Oliveira, André Fernando de

CDD 660.2972

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às quatorze horas do dia vinte e um de maio de dois mil e sete, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Contribuição para o estudo do comportamento eletroforético e de ácido-base para alguns compostos de interesse veterinário" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Aline de Camargo Bilitardo Abib**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores André Fernando de Oliveira e Astréa F. Souza Silva da Universidade de Mogi das Cruzes e Orlado Fatibello-Filho da Universidade Federal de São Carlos, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 21 de maio de 2007

Comissão Examinadora

Julgamento

[Assinatura]  
Prof. Dr. André Fernando de Oliveira

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]  
Prof. Dr. Astréa F. Souza Silva

APROVADO  
(aprovado(a)/reprovado(a))

[Assinatura]  
Prof. Dr. Orlando Fatibello-Filho

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao meu marido Carlos que me incentivou e me apoiou em todos os momentos, e ao meu sogro Antônio que me ajudou financeiramente e moralmente.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Prof. André Fernando e a todos os funcionários desta instituição que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A avaliação do comportamento ácido base de componentes ativos de medicamentos é fundamental para o desenvolvimento de métodos analíticos visando garantia de qualidade nas quantificações, assim como auxiliar no estudo do comportamento farmacológico dos mesmos. Mediante o uso da técnica de eletroforese capilar em zona livre, foi estudado o comportamento ácido-base dos componentes de um pentabiótico de uso veterinário, formado pela associação de estreptomicina, dihidroestreptomicina, benzilpenicilina e os contra-íons benzatina e procaína. A variação da mobilidade eletroforética destas espécies químicas foi estudada na faixa de pH entre 5,0 a 9,5 em diferentes sistemas tampão com força iônica controlada em 50 mmol/L com NaCl como eletrólito inerte. As curvas de mobilidade eletroforética em função do pH possibilitaram a estimativa de valores de pKa para as espécies mencionadas, mediante o ajuste de modelos estatísticos não lineares. O valor de pKa estimado para o grupo amina da benzatina foi de  $9,490 \pm 0,002$ . No caso da procaína, não foi possível estimar o pKa do grupo amino ligado ao anel aromático. O segundo pKa, contudo, referente ao grupo amina alifática ligada ao ácido p-aminobenzóico foi estimado em  $9,44 \pm 0,06$ . Estes valores estão em boa concordância com os reportados na literatura. Entretanto, no caso da estreptomicina e dihidroestreptomicina, onde se observa a existência de 3 grupos aceptores de próton (um grupo aminico e 2 grupos guanidínicos) não foi possível estimar os valores de pKa mediante o emprego do método proposto. Os valores de pKa usualmente observados para estes grupamentos encontram-se respectivamente entre 9 e 11 e acima de 11. Uma diferença menor que 4 unidades de pKa entre os grupamentos aceptores dificulta a aplicação do método. No caso da benzilpenicilina, verificou-se mobilidade eletroforética constante na faixa de pH estudada, evidenciando que o valor de pKa do grupo amino deve ser inferior a 4.

**Palavra – chave:** eletroforese capilar, estreptomicina, fluxo eletroosmótico.

## ABSTRACT

The evaluation of the base acid behavior of the drugs is fundamental to develop the analytical methodologies assessing quality in quantification, as well as an auxiliary in their pharmacological behavior study. It was studied acid-base behavior of the components of a veterinary pentabiotic formed by the association of streptomycin, dihydrostreptomycin, benzylpenicillin and the counterions benzatine and procain using free zone capillary electrophoresis. The variation of the electrophoretic mobility of these chemical species was studied in the pH range from 5,0 to 9 with controlled ionic strength solution with 50 mmol/L NaCl as inert electrolyte. The pKa values was estimated through the electrophoretic mobility - pH curves using the adjustment of non linear static models. The estimate pKa value for the benzatine amino group was  $9.490 \pm 0.002$ . In the case of procaine it was not possible to estimate the amino group pKa connected to the aromatic ring. The second pKa, though, referring to the aliphatic amino group connected to the p-aminobenzoic acid was estimated in  $9.44 \pm 0.06$ . These values are in accordance to the ones reported in the literature. However, in the case of streptomycin and dihydrostreptomycin the chemical species where it was observed the existence of 3 proton acceptor groups (one aminic group and 2 guanidinic groups) it was not possible to estimate the pKa values using the proposed method. The pKa values usually observed for these groups are respectively between 9 and 11 and above 11. A difference inferior to 4 pKa units among the acceptors groups makes the method application difficult. In the case of benzylpenicillin it was verified constant electrophoretic mobility of the pH strip studied, proving that the pKa value of the amino group must be inferior to 4.

**Keywords:** Electrophoresis, streptomycin, electroosmotic flow

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Comparação entre as estruturas da estreptomicina e diidroestreptomicina. A região tracejada é o grupo que diferencia esses antibióticos.....16
- Figura 2:** Diagrama simplificado das etapas do desenvolvimento de um método de separação em EC com detecção UV-vis.....22
- Figura 3:** Representação do fluxo eletrosmótico. Círculos com carga representam íons ou grupos ionizados das paredes do capilar. Setas representam o sentido do movimento. A seta transparente representa o EOF.....26
- Figura 4:** Variação da condutividade das soluções tampão borato, tris e carbonato em função de pH, em meio de força iônica constante,  $I=0,05$  mol/L; temperatura igual  $25^{\circ}\text{C}$ .....49
- Figura 5:** Variação da condutividade das soluções tampão fosfato, acetato, borato e carbonato em função de pH, sem ajuste de força iônica temperatura igual a  $25^{\circ}\text{C}$ .....50
- Figura 6:** Comportamento da condutividade do tampão borato em diversos valores de pH, com força iônica ajustada para 50 mmol/L. Ajuste com Sigmoidé de Boltzmann.....52
- Figura 7:** Comportamento da condutividade do tampão borato em diversos valores de pH, com força iônica ajustada para 50 mmol/L. Ajuste com Sigmoidé de Boltzmann.....53
- Figura 8:** Estimativa do pKa do ácido bórico em força iônica 0,05 mol/L baseado na interpolação da força iônica. O círculo vazado é o valor obtido nesse trabalho.....53
- Figura 9:** Espectros de absorção dos sistemas tampão.....54
- Figura 10:** Corrente elétrica em eletroforese capilar de sistemas tampão em função do pH. Tensão elétrica de 15kV e capilar de 60 cm de comprimento e 50 $\mu\text{m}$  de diâmetro interno.....55
- Figura 11:** Estruturas das espécies totalmente protonadas da (A) o-toluidina e do (B) fenol.....56
- Figura 12:** Comportamento da o-toluidina em função do pH. (A) curva de distribuição de espécies; (B) carga efetiva.....57

<b>Figura 13:</b> Espectro na região do UV-visível da o-toluidina.....	57
<b>Figura 14:</b> Comportamento da o-toluidina em função do pH. (A) curva de distribuição De espécies; (B) carga efetiva.....	58
<b>Figura 15:</b> Espectro do fenol na região do UV-visível.....	58
<b>Figura 16:</b> Espectro de absorção da Benzatina na região do ultravioleta do espectro Eletromagnético.....	59
<b>Figura 17:</b> Estrutura do ácido de Bronsted da benzatina.....	60
<b>Figura 18:</b> Comportamento da mobilidade efetiva da benzatina em função do pH do eletrólito em meio com força iônica não controlada. Os pontos circulados foram obtidos em tampão borato. (abaixo) Estrutura da benzatina na forma protonada.....	61
<b>Figura 19:</b> Comportamento eletroforético da Benzatina em diferentes valores de pH em meio com força iônica constante.....	61
<b>Figura 20:</b> Estrutura química da procaína na forma totalmente protonada.....	62
<b>Figura 21:</b> Mobilidade eletroforética efetiva da procaína. Tensão de 15 kV, força iônica 50 mmol/L.....	63
<b>Figura 22:</b> Espectro da procaína na região do UV-visível.....	63
<b>Figura 23 A:</b> Mobilidade Eletroforética da estreptomicina. () presença de borato 50 mmol/L <b>Figura 23B</b> : Estrutura da Estreptomicina.....	64
<b>Figura 24:</b> Método das Variações Contínuas para o complexo de boro – estreptomicina.....	65
<b>Figura 25:</b> Efeito do pH sobre a mobilidade efetiva da benzilpenicilina.....	66
<b>Figura 26:</b> Estrutura da benzilpenicilina.....	66
<b>Figura 27:</b> Espectro na região do UV-visível para a benzilpenicilina.....	67
<b>Figura 28:</b> Comportamento do EOF em função do pH.....	68
<b>Figura 29:</b> Comportamento da mobilidade aparente da estreptomicina em diferentes valores de pH e tipos de sistema tampão.....	69
<b>Figura 30:</b> Comportamento da mobilidade aparente da estreptomicina em diferentes valores de pH e tipos de sistema tampão.....	70

<b>Figura 31:</b> Eletroferograma do benzetacil em 190 nm e vista em 3D.....	71
<b>Figura 32:</b> Eletroferograma da despacilina.....	71
<b>Figura 33:</b> Eletroferograma de uma amostra de Pentabiótico.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Detectores utilizado em EC e faixa de limites de detecção.....	21
<b>TABELA 2:</b> Relação de eletrólitos mais utilizados com seus respectivos valores de pKas.....	30
<b>TABELA 3:</b> Relação de solução tampão de maior uso em CE com suas respectivas faixas de pH e valor de comprimento de onda .....	31
<b>TABELA 4:</b> Aditivos utilizados na EC e sua respectiva função .....	32
<b>TABELA 5:</b> Valores de força iônica inicial do tampão borato 50 mmol/l em diversos valores de pH e valores de massa de NaCl adicionados para ajuste final da força iônica.....	41
<b>TABELA 6:</b> Valores de força iônica inicial do tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 23,5 mmol/l em diversos valores de pH e valores de massa de NaCl adicionados para ajuste final da força iônica.....	42
<b>TABELA 7:</b> Valores de força iônica inicial do tampão Tris 50 mmol/L em diversos valores de pH e valores de massa de NaCl adicionados para ajuste final da força iônica.....	43
<b>TABELA 8:</b> Valores de força iônica inicial do tampão $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mmol/L em diversos valores de pH.....	45
<b>TABELA 9 :</b> Componentes presentes na solução estoque de Benzetacil e suas respectivas concentrações. ....	46
<b>TABELA 10:</b> Componentes presentes na solução estoque de Despacilina e suas respectivas concentrações.....	46
<b>TABELA 11:</b> Componentes presentes na solução estoque de Agrovet e suas respectivas concentrações.....	47
<b>TABELA 12:</b> Descrição dos solutos presentes no pentabiótico e suas concentrações.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**DIOH** = dihidroestreptomicina

**EC** = eletroforese capilar

**Ea** = Energia de ativação de Arrhenius

**EOF** = fluxo eletrosmótico

**Ka** = constante de equilíbrio ácido-base

**L** = condutância

**MEKC** = cromatografia capilar eletrocínética micelar

**STR** = estreptomicina

**t** = tempo de migração

$\mu_{\text{eff}}$  = mobilidade efetiva

$\kappa$  = condutividade elétrica

$\lambda_i$  = condutividade molar da espécie i

$\Lambda$  = condutividade molar do composto

**I** = força iônica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Estreptomicina .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Quantificação da Estreptomicina.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Eletroforese Capilar .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Princípio da Técnica.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Aplicações da Eletroforese Capilar .....</b>	<b>22</b>
<b>1.6 Eletroforese Capilar de Zona (CZE) .....</b>	<b>25</b>
<b>1.7 Cromatografia Capilar Eletrocínética Micelar (MEKC) .....</b>	<b>32</b>
<b>1.8 Focalização Isoelétrica Capilar .....</b>	<b>33</b>
<b>1.9 Isotacoforese Capilar .....</b>	<b>34</b>
<b>1.10 Eletroforese Capilar em Gel .....</b>	<b>34</b>
<b>1.11 Eletrocromatografia Capilar .....</b>	<b>35</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>36</b>
<b>3 MÉTODO.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Padrões e reagentes .....</b>	<b>37</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Estudo da dependência da condutividade do tampão em relação ao pH e a força iônica do meio.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Espectros de absorção dos sistemas tampão na região do ultra-violeta .....</b>	<b>53</b>
<b>4.3 Estudo da influência do eletrólito sobre a corrente elétrica .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Seleção do marcador de EOF.....</b>	<b>55</b>
<b>4.5 Influência do pH sobre a mobilidade eletroforética .....</b>	<b>58</b>

<b>4.6 Comportamento do EOF .....</b>	<b>68</b>
<b>4.7 Influência da temperatura sobre a mobilidade .....</b>	<b>69</b>
<b>4.8 Eletroferogramas em diferentes condições .....</b>	<b>71</b>
<b>5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Estreptomicina

A estreptomicina foi descoberta por Waksman em 1943, obtida a partir do fungo *Streptomyces griseus*. Esta descoberta lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina em 1952 (GOODMAN, 1996).

A ação farmacológica desta substância se baseia na inibição do crescimento do bacilo da tuberculose, assim como de outros microorganismos aeróbios quando usado em combinação com outras drogas. Seu funcionamento está relacionado com a inibição da síntese protéica além de danificar a membrana celular de microorganismos susceptíveis (GOODMAN, 1996).

Além da tuberculose, a estreptomicina associada à penicilina é utilizada para tratar endocardite bacteriana provocando efeito bactericida sinérgico contra cepas de enterococos e estreptococos D (GOODMAN, 1996).

Seu uso deve ser limitado em decorrência de efeitos adversos de nefrotoxicidade e ototoxicidade. No que se refere a ototoxicidade, o uso de aminoglicosídeos pode levar a má disfunção vestibular e auditiva. No caso da nefrotoxicidade, de 8% a 26% dos pacientes tratados com algum antibiótico da categoria dos aminoglicosídeos apresentam disfunção renal branda (CURTIS, SUTTER, WALKER, HOFFMAN, 1999; GOODMAN, 1996).

Nos anos 50, com o aparecimento de novas cepas resistentes, e um alto índice de toxicidade da estreptomicina, esta droga foi substituída por uma combinação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida no combate à TB, combinação utilizada até hoje (GOODMAN, 1996).

Seu uso, porém, tem grande importância no campo veterinário onde a estreptomicina passou a ser utilizada associada à outros antibióticos (GOODMAN, 1996). Esta associação é feita principalmente com penicilinas onde se obtém uma rápida absorção devido associação com penicilina potássica, e ao mesmo tempo

uma absorção lenta devido associação com penicilina benzatina (GOODMAN, 1996).

Esta associação é cientificamente reconhecida e tem por objetivo ampliar o espectro bacteriano, evitar o aparecimento de cepas resistentes e reduzir o toxicidade (GOODMAN, 1996).

Quimicamente a estreptomicina é classificada com um antibiótico aminoglicosídeo, sendo caracterizada como um polícatión contendo aminoaçúcares ligados por ligações glicosídicas à um núcleo hexose ou aminociclitol, que no caso da Estreptomicina é a *estreptidina* e para os demais aminoglicosídeos é a *desoxiestreptamina* (GOODMAN, 1996). A predominância das espécies carregadas desses compostos em solução faz com que sejam pouco absorvidos via oral, mas rapidamente absorvidos via intra muscular atingindo uma concentração plasmática dentro de 30 a 90 minutos (GOODMAN, 1996).

Estes antibióticos podem ser produzidos por processo químico, porém a fermentação é um processo mais rápido e assim mais econômico.

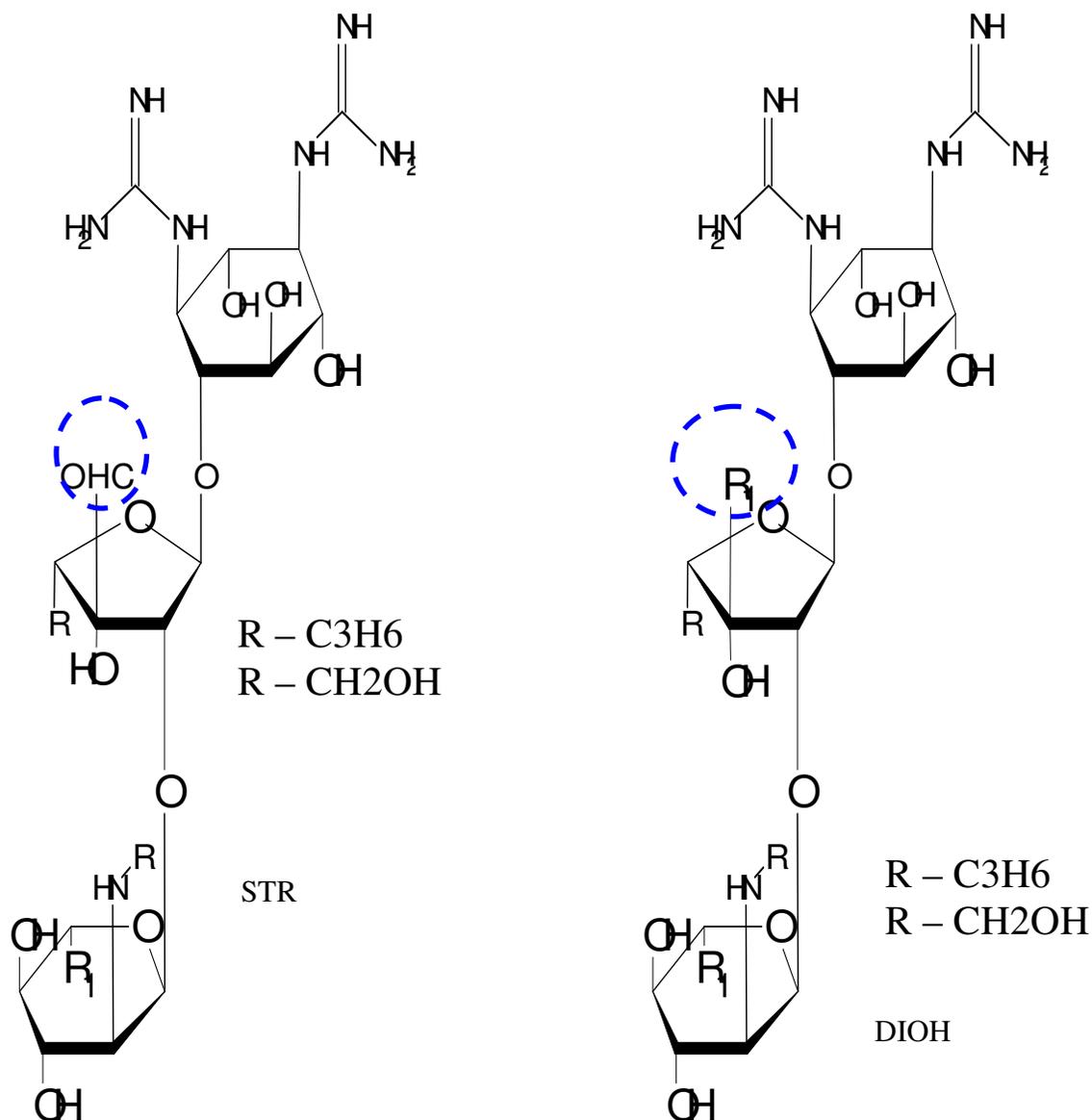
Waksman et al , classificaram a estreptomicina como base orgânica solúvel em água. No estado sólido, a estreptomicina está usualmente na forma de cloridrato, sulfato ou fosfato, e em relação a sua solubilidade, são solúveis em água e insolúveis em clorofórmio, álcool e éter (MARTINDALE, 1996).

Em 1945, Carter et al desenvolveram métodos de isolamento e purificação da estreptomicina por cromatografia em colunas de alumina .

A diidroestreptomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, porém pouco utilizado devido a elevada ototoxicidade. No entanto, é utilizada na maioria das vezes associada à outros antibióticos. Sua estrutura química é muito similar àquela da estreptomicina (Figura 1), diferindo apenas no grupo funcional, estreptose (GOODMAN,1996).

## 1.2 Quantificação da Estreptomicina

Atualmente, os carboidratos são de grande importância por estarem presentes em vários campos, como bioquímica, biologia, farmácia biotecnologia e alimentação.



**Figura 1:** Comparação entre as estruturas da estreptomicina e diidroestreptomicina. A região tracejada é o grupo funcional que diferencia esses antibióticos. Fonte: (do autor)

As técnicas mais utilizadas para a determinação de carboidratos são cromatografia de camada fina, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (JAGER, 2001).

No caso de antibióticos aminoglicosídeos, a quantificação também pode ser feita por diversos métodos, principalmente por espectrofotometria molecular e HPLC.

Dentre os métodos espectrofotométricos recomendados pela Farmacopéia Brasileira, cita-se a formação de maltol pela hidrólise da estreptose em meio alcalino a quente e reação com ferro (III), a quantificação através da reação de Sakaguchi, envolvendo o grupo guanidínico da estreptomicina; e por fim, a reação da glucosamida com acetilacetato a quente (KOROLKOVAS, 1988).

Todos os métodos citados não distinguem diretamente a estreptomicina da diidroestreptomicina. Os produtos da hidrólise em meio ácido de cada antibiótico apresentam máximos de absorção em 265 nm, no caso da diidroestreptomicina e máximos de 245 e 315 nm e um vale em 285 nm para o produto da estreptomicina. A redissolução seletiva de diidroestreptomicina pode ser realizada em meio de cloreto de sódio. Apenas este antibiótico é solúvel em n-propanol. A reação de Sakaguchi é, então, realizada nesse meio.

Análise de antibióticos em formulação requer um método seletivo e rápido devido ao fato dos vários antibióticos terem sérios problemas de estabilidade.

A identificação e separação destes antibióticos aminoglicosídeos apresenta bons resultados quando feita por cromatografia de troca iônica, cromatografia de fase reversa, cromatografia de fase normal e eletroforese capilar, sendo a análise feita em amostras de formulações e não formulações, ou mesmo ainda para fluidos corpóreos ou alimentos.

Estreptomicina e diidroestreptomicina foram separadas por cromatografia de par iônico fase reversa por Wall, onde ácido hexanossulfônico foi usado como um reagente para formação de par iônico usado em solução aquosa de acetonitrila. Várias condições experimentais (tipos de coluna e fase móvel) foram apresentadas.

Segundo *Dutch Food & Non-Food* (GAUDIN, 2005) o nível máximo permitido de resíduos aminoglicosídeos de estreptomicina e diidroestreptomicina em leite é de 200 µg/kg. Estes resíduos têm sido analisados utilizando métodos ELISA (GAUDIN, 2005); HPLC associada a espectrofotometria de massa inclusive com derivatização em pré-coluna com fenilisocianato (KIM, 2003); TLC de fase normal e de fase reversa (BHUSHAN & ARORA, 2001).

Devido ao fato dos aminoglicosídeos formarem complexos entre os grupos amínicos e cobre(II), (YANG & TOMELLINI, 2001) propuseram um método de HPLC

com detecção indireta por fluorescência, baseado na destruição, pelo antibiótico, do complexo de cobre (II) com L-triptofano (L-Trp), o  $(\text{CuTrp}^{2+})$ , que é fluorescente. Desta forma, há uma diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração do aminoglicosídeo no meio.

Arrowood ,(ARROWOOD,1991) quantificou estreptomicina em injetáveis por cromatografia gasosa, mediante a hidrólise do antibiótico seguida da extração em clorofórmio do maltol. Este último foi derivatizado, formando o silil-éter do maltol e determinado utilizando naftaleno como padrão interno

Um estudo da caracterização estrutural da estreptomicina foi feito por espectroscopia na região do espectro UV-visível-IV . Neste estudo amostras do fármaco foram solubilizadas em água com valor de pH 7 e em solução aquosa de ácido acético 2% v/v (pH 2,80). O composto apresentou bandas de absorção em 220 e 310nm, em pH 7, características das transições eletrônicas p-p\* e n-p\*, associadas aos grupos C=N e C=O presentes no fármaco, respectivamente. Já em meio ácido, ocorreram absorções em 230, 280 e 320 nm.

A eletroforese capilar é uma ótima alternativa para a determinação de carboidratos proporcionando rapidez, reprodutibilidade exatidão e precisão.

Wallingford e Ewing (KUHN,1991) verificaram que a mobilidade eletroforética da estreptomicina é influenciada por borato, provavelmente devido a complexação deste com as hidroxilas vicinais da estreptomicina, o que tornaria viável a determinação de estreptomicina por eletroforese capilar a partir da complexação com borato e detecção direta com UV (KUHN , 1991).

A resolução da diidroestreptomicina foi possível pela adição do surfactante catiônico miristiltrimetilamônio, pela inversão do fluxo eletrosmótico e, portanto, revertendo a ordem de migração. Isso fez com que as impurezas da estreptomicina migrassem antes do pico principal.

É importante citar que tanto a estreptomicina como a diidroestreptomicina têm grande importância na separação de compostos quirais (LIE, COSTAPINTO) por eletroforese capilar devido à sua propriedade de enantiosseletividade, comportando – se como seletores quirais (ABOUL, 2000; DESIDERIO, FANALI, 1998; NISHI, 1996).

### 1.3 Eletroforese Capilar

A eletroforese é uma técnica de separação amplamente utilizada em estudos bioquímicos e se baseia na separação de moléculas carregadas sob a influência de um campo elétrico (ALTRIA, 2003; ALTRIA, 1996; CAMILLERI, 1993; COLOMBARA, 1997, HERJETEN, 1981).

A técnica de eletroforese mais conhecida e utilizada para a separação de compostos biologicamente ativos como proteínas e enzimas é a eletroforese em gel ou *slab* gel, onde se utiliza de placas com filmes de gel de alta porosidade. Uma desvantagem desta técnica é a possível degradação dos compostos, distorção de bandas, etc. causado pelo aquecimento do meio devido ao efeito Joule, que aumenta com o aumento da concentração de íons no meio.

Com a finalidade de minimizar os efeitos causados pelo efeito Joule, Hjertén (1981) propôs um sistema de eletroforese onde a separação ocorria dentro de um tubo de pequeno diâmetro sob rotação. Ele estudou capilares com diâmetros na faixa de 25-100  $\mu\text{m}$ , observando uma diminuição da dissipação de calor em decorrência da relação entre a área de contato e o volume interno do capilar.

Jorgenson e Lukas (JORGENSON, 1981) propuseram a forma atual da eletroforese utilizando capilares com diâmetros de 50-75  $\mu\text{m}$  sem a rotação dos mesmos.

Em 1984 foi proposta a cromatografia capilar eletrocínética micelar (MEKC) visando a separação de compostos neutros, onde, com auxílio de surfactantes em concentrações acima da concentração crítica micelar, é formado um sistema bifásico onde as micelas se movimentam em direção do detector, permitindo a separação dos analitos por diferenças na sua partição entre a solução aquosa e as micelas, alterando assim suas velocidades.

A partir do início dos anos 90 esta nova técnica tornou-se comercialmente viável e o sucesso desta técnica é devido à sua simplicidade, rapidez e economia,

principalmente quando comparada com a HPLC (ALTRIA, 2003; ALTRIA, 1996; CAMILLERI, 1993; COLOMBARA, 1997; GORDON, 1988).

## 1.4 Princípio da Técnica

O princípio da técnica de CE se baseia na mobilidade eletroforética efetiva dos analitos devido à aplicação de uma tensão elétrica entre soluções nas extremidades do capilar e devido às características iônicas dos analitos, eletrólitos, e parede do capilar (JAGER ;TAVARES, 2001; LANDERS, 1997; REINHARD, 1993 ;SANTORO, 2000; WEINHBERGER, 1993 ; SANTOS, NERENBERG, 1968).

O capilar, de sílica fundida, usualmente de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e cerca de 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo revestido por um filme de poliimida para auxiliar na resistência mecânica . Devido à grande absorção de UV pela poliimida, é necessário criar uma janela no capilar para ocorrer a detecção, ou seja, uma pequena região do capilar (1-2 mm) onde não há o revestimento pelo filme. O comprimento do capilar varia de 25 a 100 cm, enquanto que o detector fica posicionado a cerca de 10-20 cm do final do capilar (JORGENSEN, 1981 ; KUHN, 1993; LANDERS, 1997; REINHARD, K, 1993).

Cada extremidade é então introduzida em um reservatório com eletrólito contendo eletrodo, geralmente de platina, nos quais é aplicada uma tensão elétrica.

Após a aplicação de uma tensão elétrica da ordem de 5 a 30 kV entre os eletrodos de platina, ocorrem movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos levando a separação dos analitos que se move em direção ao eletrodo apropriado passando pelo detector .A corrente elétrica gerada, na faixa de 10 a 300  $\mu\text{A}$ , dependendo do eletrólito utilizado e tensão elétrica aplicada.

Antes da utilização do capilar, o mesmo deve ser pré-condicionado, para manter as paredes de sílica no mesmo estado a cada corrida eletroforética. Esse condicionamento é realizado usualmente lavando o capilar internamente com um volume de NaOH 100 mmol/L (ou menor) equivalente a 5 a 15 volumes do capilar,

seguido do mesmo volume de água. Em alguns protocolos, é utilizado HCl também. Em seguida o capilar é lavado com o eletrólito que será usado na separação.

Assim como em HPLC, uma enorme gama de detectores podem ser utilizados em EC, tais como aqueles baseados na absorção na região do UV-visível, fluorescência, fluorescência induzida por *laser*, espectrometria de massas, condutividade, amperometria, radioatividade, índice de refração, dicroísmo circular e Raman (FRACASSI, 2003).

A escolha do detector depende das propriedades do analito e da faixa de concentração de interesse. A Tabela 2.1 relaciona o tipo de detector e a faixa de concentração do soluto ideal para a utilização.

Usualmente a maior parte dos equipamentos comerciais oferece detectores UV-visível de feixe simples, além de detectores *diode array* operando em um comprimento de onda de 190 a 760 nm. Isto por que grande parte das análises podem ser realizadas com estes tipos de detectores.

**Tabela 1:** Detectores utilizados em EC e faixa de limites de detecção .

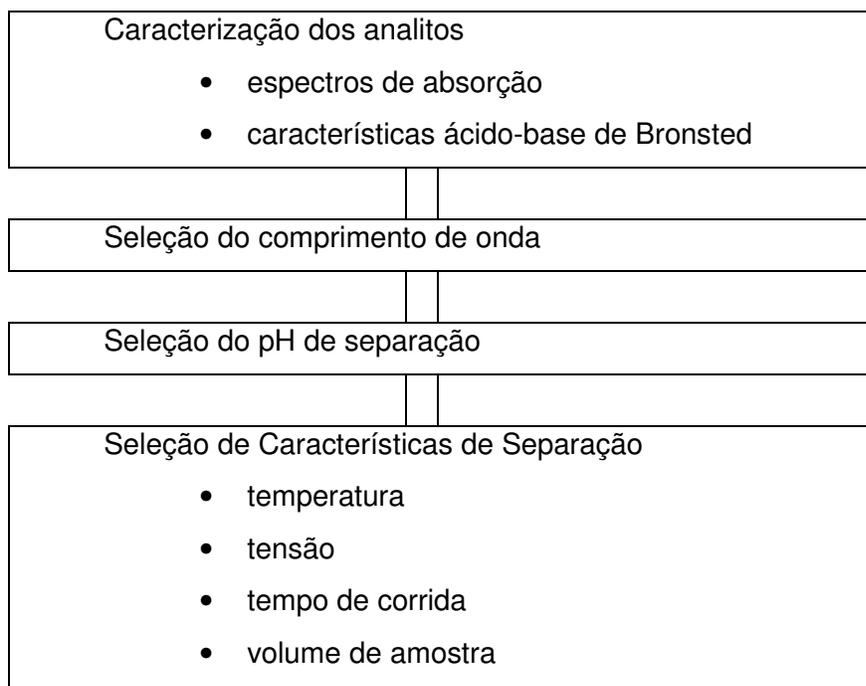
Fonte: (do autor)

DETECTOR	LOD (mol/L)
Absorção no UV – vis	$10^{-5} - 10^{-8}$
Fluorescência direta	$10^{-7} - 10^{-9}$
Fluorescência induzida por <i>laser</i>	$10^{-14} - 10^{-16}$
Amperometria	$10^{-8} - 10^{-9}$
Raman	$10^{-6} - 10^{-7}$
Espectrometria de massas	$10^{-4} - 10^{-9}$

Antes da análise da substância, é importante se ter algumas informações sobre a amostra para assim determinar o melhor modo de eletroforese capilar a utilizar, como por exemplo:

- ❖ a estabilidade térmica dos analitos
- ❖ os outros componentes que podem estar incorporados na amostra
- ❖ os tipos e os valores de pKa dos grupos ionizáveis
- ❖ presença de proteínas ou peptídeos
- ❖ solubilidade dos analitos
- ❖ máximos de absorção

Tendo estas informações é possível se fazer um diagrama de como proceder em uma análise em eletroforese capilar com detecção no UV-visível, como apresentado na Figura 2.



**Figura 2:** Diagrama Simplificado de etapas do desenvolvimento de um método de separação em EC com detecção UV-vis. Fonte: (do autor)

## 1.5 Aplicações da Eletroforese Capilar

Inicialmente a aplicação da eletroforese em gel esteve restrita para biomoléculas como proteínas e peptídeos, enquanto que as pequenas moléculas ou íons de interesse farmacêutico ou agroquímicos eram analisados por outras técnicas, tais como HPLC (SANTORO, 2000 ; TAVARES, 1997).

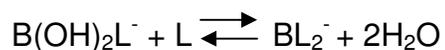
A eletroforese capilar permitiu a aplicação para diversos tipos de analitos. Atualmente ela vem sendo utilizada em praticamente todas as áreas pois a eletroforese capilar permite a análise de íons inorgânicos e orgânicos, tais como: ácidos orgânicos, fármacos, de DNA e ácidos nucleicos (onde até então eram analisados em eletroforese em gel) etc, além de espécies neutras em meio micelar, como por exemplo, a análise de hidrocarbonetos aromáticos e vitaminas (ROCHA, 2005; JORGENSON, 1981 ; LANDERS, 1997 REINHARD, 1993).

O interesse em se analisar o DNA por EC é tão grande que já existe comercialmente kits padrão incluindo soluções de poliacrilamida ou celulose. Neste caso os capilares utilizados são geralmente revestidos a fim de eliminar o EOF.

A aplicação da EC também envolve análises forenses e em toxicologia clínica, com a validação de métodos para a determinação de drogas de abuso ou ilícitas em amostras biológicas incluindo sangue, saliva e cabelo.

Vale ressaltar que analitos com baixa absorvidade molar podem ser detectadas com detector UV-visível utilizando baixo comprimento de onda no UV, ou por detecção indireta e finalmente, por derivatização em pré-coluna, além do que outros detectores, tais como amperométricos ou fluorimétricos também podem ser utilizados.

Um estudo feito por Kuhn ( 1991) demonstrou que o uso de borato favorece a separação de carboidratos pela formação de ânions complexos de boro com o grupos hidroxilas vicinais, e a derivatização para sua determinação. Após comprovar a complexação e determinar as constantes de estabilidade por método polarimétrico, Böeseken (KUHN, 1991), concluiu que para carboidratos cíclicos contendo apenas grupos hidroxilas vicinais com configuração 'cis' formam complexos estáveis. As equações do equilíbrio podem ser representadas:



onde L é o poliol  $\text{R(OH)}_2$ , ou seja, um composto com duas hidroxilas vicinais.

Doze aminoglicosídeos foram estudados e separados por EC com complexação com boro e detecção indireta . A quantificação da diidroestreptomicina e da estreptomicina na faixa de 0,050 a 1,0 mg/mL foi realizada em 160 mmol/L bórax (KUHN, PAULUS, GASEMANN, WIDMER, 1996).

Íons metálicos e pequenos íons orgânicos e inorgânicos também estão sendo analisados por EC tendo excelente aceitação, principalmente devido a solução teste ser usualmente aquosa e devido o soluto ser pequeno. Geralmente estes analitos não tem cromóforos e são detectados utilizando detecção UV indireta .

As análises de produtos farmacêuticos são predominantemente realizadas usando HPLC, incluindo análise do componente principal da formulação, das impurezas, separação quiral e quantificação de metais. Porém, estas análises são totalmente viáveis em EC, sendo atualmente não só validadas como já sendo incluídas com sucesso em bases de referência .Uma grande vantagem é que a maioria das drogas farmacêuticas apresentam comportamento ácido-base de Bronsted, muitos dos quais apresentam grupos aminícos protonáveis.

Em relação às impurezas de produtos farmacêuticos, tem sido relatados estudos onde é possível uma determinação de 0,1% área/área, como por exemplo, a determinação de impurezas de salicilamida em meio micelar de SDS .

A separação de compostos insolúveis usualmente envolve o uso de um co-solvente e meio micelar (devido à ausência de carga), enquanto que drogas farmacêuticas quirais produzidas como misturas racêmicas ou algum excesso enantiomérico tem sido analisada por EC e tem apresentado separações muito boas em tempo relativamente curtos (em comparação com HPLC) assim como baixo custo de análise, grande simplicidade e robustez. Da mesma maneira, separação de drogas

quirais em fluidos também já foi relatada, tendo como exemplos a determinação de enantiômeros de dimetindena na urina ou a determinação da leucovorina no plasma (KIM, 2003).

Assim como em outras técnicas de eletroforese, a eletroforese capilar pode ser usada em diferentes modos: eletroforese de zona (CZE), com focalização isoelétrica (IEF), e isotocoforese (ITP). A eletroforese capilar de zona pode ainda ser dividida em eletroforese capilar de zona livre (FSCE), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), eletrocromatografia e eletroforese capilar em gel.

Para a indústria farmacêutica a principal referência é a *International conference on Harmonization* que contém várias recomendações em relação às características a serem testadas para a maioria dos procedimentos analíticos em um laboratório farmacêutico. Sendo assim, é importante relatar sobre os procedimentos para a validação da eletroforese capilar onde inclui testes de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação (ALTRIA, 2001; RIBANI *et al.*, 2004).

A seletividade, por exemplo, segundo literatura descreve como a habilidade do método de discriminar o analito frente a todas as substâncias interferentes. Para o método de identificação, a seletividade é obtida comparando a resposta da amostra contendo somente o analito em questão com a resposta da amostra. No método de CE, este teste é feito injetando uma solução teste com produtos de degradação. É importante que se faça uma análise sob condições de *stress* onde se altera pH, temperatura, umidade e luz. Outra forma de validar a seletividade é comparar o espectro de absorção do pico na solução de referência e do mesmo pico na amostra. A similaridade do espectro está associado a esse conceito. Neste caso, é necessário o uso de um detector *diode array* incorporado a eletroforese capilar.

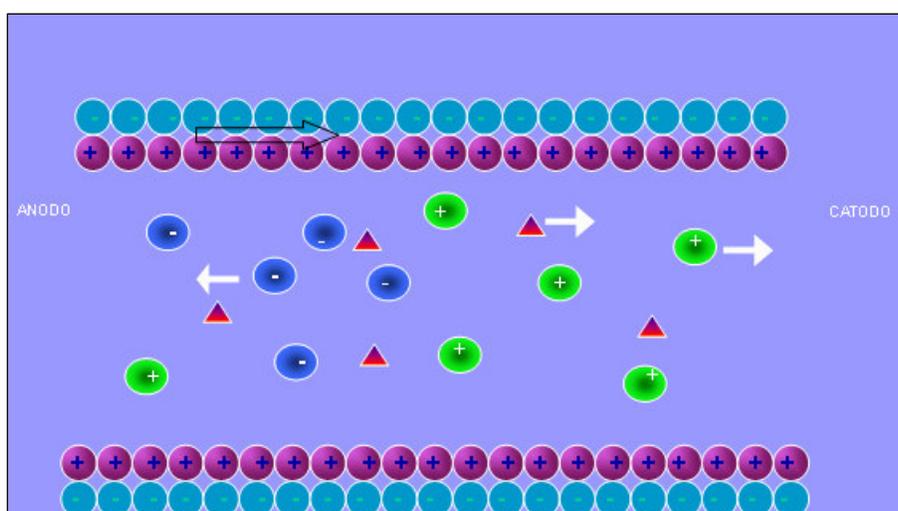
A robustez, por outro lado, relata a capacidade do método em permanecer inalterado com pequenas, mas deliberadas variações introduzidas nos parâmetros do método. Em EC o teste de robustez detecta fatores que podem influenciar o doseamento a sensibilidade e a seletividade.

## 1.6 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

A instrumentação da EC envolve uma fonte de alta tensão, um capilar de sílica recoberto com poliimida, dois reservatórios para os eletrólitos e que acomodam o capilar e os eletrodos e um detector (TAVARES, 1997).

Um efeito muito importante na eletroforese capilar é o fluxo eletroosmótico (Figura 3). Este fenômeno foi relatado pela primeira vez em meados de 1808 por Reuss e estudada por vários pesquisadores, inclusive por Helmholtz. Sua aplicação em sistemas de separação foi proposta apenas em 1952 por Mould e Synge, onde eles utilizaram um sistema de cromatografia de camada delgada. Este procedimento foi aperfeiçoado por Pretorius 1974, com a aplicação em cromatografia de coluna.

O EOF está relacionado com a formação de cargas na superfície do capilar em contato com eletrólito e com o pH do mesmo. Isto ocorre porque a parede do capilar contém grupos silanóis (SiOH), que, quando em contato com soluções com pH acima de 3 se dissociam resultando em uma superfície carregada negativamente, devido ao seus pKa's. Em pH abaixo de 3 a ionização dos grupos silanóis é tão pequena que o EOF é insignificante, enquanto que em pH acima de 9 o EOF é muito elevado, chegando a valores da ordem de  $5 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2/(\text{Vs})$ .



**Figura 3** : Representação do Fluxo Eletroosmótico. Círculos com carga representam íons ou grupos ionizados das paredes do capilar. Setas representam o sentido do movimento. A seta transparente representa o EOF. Fonte: (do autor)

Para manter a eletroneutralidade, os grupos silanoatos atraem os cátions da solução tampão havendo assim a formação de uma dupla camada da Helmholtz e da camada difusa de Stern. Com a aplicação de um campo elétrico, os cátions migram em direção ao cátodo por eletroforese, e as espécies neutras e aniônicas são arrastadas pelo fluxo eletroosmótico, ou seja, são arrastados pela segunda camada de cátions da parede do capilar.

No caso da polaridade estar direcionada do ânodo para o cátodo, o que ocorre na maioria das vezes, os ânions migram por último devido sua atração pelo ânodo, porém o EOF acaba prevalecendo e levando os ânions em direção ao cátodo.

A magnitude do EOF está, portanto, diretamente relacionada com o pH do meio, devido à desprotonação dos grupos silanóis, ou seja, quanto maior o pH maior o EOF, enquanto que o aumento da força iônica promove a diminuição deste por alterar o potencial zeta e diminuir a espessura da dupla camada de cátions ( SANTORO, 2000 ; TAVARES, 1997).

O comportamento do EOF, entretanto, depende também de processos cinéticos de hidratação da sílica, o que ocasiona a obtenção de diferentes comportamentos de acordo com o tipo de pré-condicionamento do capilar (JORGENSEN, 1981 ; KUHR, 1990; LANDERS, 1997).

A movimentação dos íons gerada pelo EOF leva a um perfil radial linear, o que impede a dispersão das bandas e garante uma alta eficiência na separação. Isto não ocorre, por exemplo na HPLC , onde a movimentação do analito ocorre por pressão, levando a um o perfil de fluxo parabólico (SANTORO, 2000).

Algumas substâncias comumente utilizadas como marcadores de EOF incluem dimetilformamida, dimetilsulfóxido, aldeído salicílico, *etc.* O requisito principal para a seleção de uma espécie química como marcador de EOF é que no pH de trabalho sua carga efetiva seja igual nula.

Em EC também é comum a utilização de aditivos com o objetivo de não só alterar a mobilidade do soluto, mas também para modificar o fluxo eletroosmótico. Como aditivos de eletrólitos estão solventes orgânicos solúveis, ciclodextrinas (SALVATORI, 1991), ácidos sulfônicos, éteres-coroa e surfactantes entre outros (TAVARES, 1997).

A mobilidade eletroforética  $\mu$  de uma espécie química é a razão entre sua velocidade linear e a intensidade de campo elétrico aplicado:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (2.1)$$

A mobilidade aparente é a mobilidade resultante da mobilidade eletroforética efetiva do composto ( $\mu_{eff}$ ) e do EOF:

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF} \quad (2.2)$$

A mobilidade eletroforética efetiva pode, então, ser calculada a partir dos parâmetros do sistema de eletroforese:

$$\mu_{eff} = \frac{l.L}{V} \left( \frac{1}{t} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (2.3)$$

, onde (l) é a distância do ponto de injeção até o detector; (L) é o comprimento do capilar; (V), a tensão elétrica aplicada; (t) tempo de migração do composto no sistema eletroforético e ( $t_{EOF}$ ) tempo de migração do EOF.

O tempo do EOF é obtido experimentalmente com auxílio de um composto neutro que seja facilmente detectado.

Uma vez que um composto pode participar de vários equilíbrios no meio, tais como equilíbrios ácido-base de Bronsted, de complexação ou de partição, cada espécie envolvida nesses equilíbrios influencia na mobilidade eletroforética aparente desse compostos. Por exemplo, para um ácido carboxílico HA, é estabelecido o equilíbrio ácido base



Assim, a base conjugada ( $\text{A}^{-}$ ) tem uma mobilidade eletroforética ( $\mu_{\text{A}^{-}}$ ) e o ácido outra ( $\mu_{\text{HA}}$ ) (embora a última, por ser de uma espécie neutra será igual a zero). A mobilidade eletroforética aparente será, portanto:

$$\mu_{app} = \alpha_{\text{A}^{-}} \cdot \mu_{\text{A}^{-}} + \alpha_{\text{HA}} \cdot \mu_{\text{HA}} \quad (2.5)$$

onde  $\alpha$  é o grau de dissociação da espécie.

A Equação 2.5 também expressa a influência do pH sobre a mobilidade aparente, uma vez que o grau de dissociação é função da constante de equilíbrio ácido e do pH do meio .

Para uma espécie poliprótica, a  $\mu_{app}$  é dada pela Equação 2.6:

$$\mu_{APP} = \sum \alpha_I \mu_I \quad (2.6)$$

O eletrólito utilizado em uma separação geralmente é uma solução tampão, que deve apresentar um valor baixo de absorvância no comprimento de onda selecionado além de uma mobilidade eletroforética baixa ou ao menos semelhante aquela do analito, evitando assim distorções no perfil da banda (TAVARES,1997).

O efeito Joule existente devido à passagem de corrente elétrica através da solução pode ser minimizado de diversas formas: (i) diminuir o campo elétrico, com conseqüente aumento do comprimento do capilar (no entanto, esta modificação no comprimento do capilar pode gerar um alargamento de banda); (ii) diminuir o diâmetro do capilar; (iii) diminuir a condutividade do eletrólito através do controle da

concentração dos sistemas tampão, sendo esta última solução a mais viável (TAVARES,1997).

Assim sendo, a concentração da solução tampão deve estar na faixa de 5 a 200 mmol/L. Concentrações muito baixas dos íons no eletrólito podem causar erros devido à adsorção dos analitos na parede do capilar (TAVARES, 1997).

Os eletrólitos mais utilizados podem ser vistos na Tabela 2.1 com seus respectivos pKas. Dentre os eletrólitos inorgânicos mais usados estão os sistemas tampão borato e fosfato a uma concentração de 10 a 50 mmol. Sistemas tampão biológicos como CAPS e TRIS podem ser usados em altas concentrações devido sua baixa condutividade porém possuem alta absorção UV, quando comparados com eletrólitos inorgânicos (TAVARES, 1997).

As propriedades do eletrólito como pH e força iônica (devido à alteração nos coeficientes de atividade) afetam tanto a seletividade como a eficiência do processo.

**TABELA 2:** Relação de eletrólitos mais utilizados com seus respectivos valores de pKas Fonte: (do autor)

Eletrólito	Pka
Fosfato	2,12
	7,21
	12,36
Citrato	3,06
	5,40
	6,40
Acetato	4,75
MÊS	6,15
PIPES	6,8
ACES	6,9
Borato	9,24
Tris	8,3
HEPES	7,55
CAPS	10,4

O pH talvez seja o parâmetro mais importante na otimização em EC, pois como apresentado influencia tanto na distribuição de espécies com diferentes cargas em solução (Equações 5 e 6) quanto os grupos silanóis das paredes do capilar.

Na Tabela 3 são apresentadas faixas usualmente utilizadas para os sistemas tampão e seus *cutoff*, ou seja, os comprimentos de onda mínimo para o trabalho em EC.

A força iônica também apresenta grande influência na separação e na comparação de eletroferogramas realizados com diferentes condições experimentais, uma vez que o mesmo está associado a mudanças na condutividade molar dos íons (e assim da mobilidade eletroforética) quanto das suas atividades, alterando assim suas distribuições de espécies.

**Tabela 3** : Relação de solução tampão de maior uso em com suas respectivas faixas de pH e valor de comprimento de onda

Tampão	Faixa de pH	$\lambda$ mínimo/nm*
Fosfato	1,2-3,2; 6,1-8,1; 11-13	195
Citrato	3,06-5,40	260
Acetato	3,76-5,76	220
MÊS	5,15-7,15	230
PIPES	5,80-7,80	215
Tricina	7,15-9,15	230
Tris	7,30-9,30	220
Borato	8,14-10,14	180
CHES	9,5	< 190

O ajuste da força iônica (I) (Equações 2.7 e 2.8) da solução tampão se faz necessário, portanto, para que os valores de mobilidade eletroforética sejam comparáveis em diferentes condições experimentais. É usualmente realizada a

correção da força iônica com a adição de um eletrólito inerte, tais como perclorato de sódio, nitrato de sódio ou potássio, cloreto de sódio, *etc.*

$$I = \frac{1}{2} \sum [i] \cdot q_i^2 \quad (2.7)$$

, onde  $\alpha$  é o grau de dissociação do íon  $i$ ;  $[i]$ , a sua concentração no equilíbrio;  $C$ , a concentração analítica e  $z$  a sua carga.

Além disso, o uso de aditivos no eletrólito é realizado para elevar ou para obter uma seletividade diferenciada na separação. Alguns dos aditivos utilizados podem ser vistos na Tabela 2.3, onde há a relação do aditivo e sua função para a análise.

**TABELA 4:** Aditivos utilizados na EC e sua respectiva função

ADITIVO	FUNÇÃO
Sais inorgânicos	Hidratação de proteína e alteração do EOF
Solventes orgânicos	Solubilização do analito e alteração do EOF
Uréia	Alteração do EOF
Ácido sulfônico	Agente de interação hidrofóbica
Surfactantes catiônicos	Interação hidrofóbica
Derivados de celulose	Redução de EOF
Aminas	Interação com analito

Tanto a injeção da amostra como o tempo de migração do soluto são dependentes da temperatura, havendo assim a necessidade de se manter a temperatura constante durante a análise. A temperatura empregada fica na faixa de 20 a 50 °C. O estudo da influência da temperatura no interior do capilar sobre o tempo de migração dos solutos deve ser realizado, uma vez que a mobilidade eletroforética aumenta em uma proporção de 2% por °C (Camilleri, 1993).

A amostra a ser analisada pode ser introduzida de três diferentes formas, sendo por gravidade, hidrodinâmica e eletrocinética. Todas envolvem a imersão do final do capilar na solução contendo a amostra em questão.

No mecanismo de introdução hidrodinâmica o capilar é introduzido na solução contendo a amostra e uma pressão é aplicada. O volume injetado por unidade de tempo pode ser calculado pela seguinte equação:

$$\frac{V}{t} = \frac{d^4}{L} \cdot \Delta P \cdot 2,479 \cdot 10^{-7} \quad (2.9)$$

Onde V = volume em  $\mu\text{L}$ , t = tempo em s; d = diâmetro interno do capilar em  $\mu\text{m}$ ;  $\Delta P$  = variação da pressão em mbar

Por injeção gravitacional, o capilar é mergulhado no reservatório da amostra que é mecanicamente elevado a cerca de 5 cm acima do nível do reservatório com o tampão por um tempo de cerca de 10 segundos. Este procedimento é mais usual em equipamentos homemade, pela dificuldade de obter pressão reprodutível de ar de maneira simples (SANTORO,2000).

Pela injeção eletrocinética, o capilar e o ânodo são mergulhados no reservatório da amostra e uma tensão é aplicada em seguida. A migração dos íons da amostra ocorre devido a mobilidade eletroforética e eletrosmótica.

## 1.7 Cromatografia Capilar Eletrocinética Micelar (MEKC)

Em virtude das limitações da EC em relação a substâncias neutras apolares, ou seja, devido a ausência de carga essas espécies são carregadas juntas pelo EOF, foi desenvolvida uma nova técnica chamada cromatografia capilar eletrocinética micelar.

A MEKC foi proposta em 1984 por Terabe *et al* (SANTORO, 2000). Nesta técnica, é adicionado ao eletrólito de corrida um surfactante iônico com concentração acima da concentração micelar crítica levando a formação de um sistema cromatográfico de duas fases, podendo se considerar um sistema análogo ao cromatográfico. A fase primária deste sistema é composta do solvente que é transportado eletrosmoticamente sob um campo elétrico, enquanto que a fase

secundária é formada pelas micelas que são atraídas pelo eletrodo adequado (SANTORO, 2000).

Os compostos hidrofóbicos, devido ao equilíbrio de partição entre a solução aquosa e o interior da micela, permanecem mais tempo na micela e migram mais lentamente em direção ao detector, enquanto que compostos iônicos são separados por eletroforese (SANTORO, 2000).

Diferentes seletividades podem ser alcançadas com diferentes surfactantes como por exemplo: surfactantes aniônicos como sal de bile ou dodecilsulfato de sódio (SDS); surfactantes catiônicos como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), ou ainda surfactantes neutros como o Twen (SANTORO, 2000).

A seletividade pode ser manipulada por diversos fatores como a concentração do surfactante, adição de uréia, adição de ciclodextrina, alteração da temperatura, pH e íon do eletrólito.

Este método tem como vantagem promover a separação de solutos iônicos além de promover a separação de compostos neutros de forma seletiva (SANTORO, M.,I.,R.,M., 2000).

## **1.8 Focalização Isoelétrica Capilar**

Neste método as substâncias são separadas pelo seu ponto isoelétrico – pI. Substâncias com diferentes pI como proteínas, peptídeos, aminoácidos e alguns fármacos podem ser analisados por este método.

Nesta técnica o capilar é preenchido com um composto anfótero e com a amostra e a separação é feita em duas fases, sendo a pré focagem e a mobilização. Uma corrente elétrica é então aplicada e os anfóteros criam um gradiente de pH e forçando a migração dos analitos em direção ao seu ponto isoelétrico, onde apresentam uma carga líquida igual a zero. Atingindo o pI, é estabelecido um estado estacionário onde a mobilidade do composto tende ao EOF (SANTORO, 2000).

## 1.9 Isotacoforese Capilar

Esta técnica se baseia nos princípios da CZE , onde a separação se dá pela diferença de mobilidade efetiva de cada íon após a aplicação de um campo elétrico.

Tanto o ânodo como o capilar são preenchidos com eletrólito denominado eletrólito líder, onde os ânions possuem mobilidade efetiva maior que qualquer espécie presente na amostra. Já os cátions presentes no eletrólito líder deve possuir poder tamponante no pH utilizado.

O cátodo é preenchido com eletrólito denominado eletrólito terminador, onde os ânions presentes possuem mobilidade efetiva mais baixa do que qualquer outra espécie (SANTORO, 2000).

É aplicado então uma corrente elétrica onde ânions migram em diferentes velocidades, porém nunca ultrapassando os ânions do eletrólito líder mas sempre chegando primeiro que os ânions do eletrólito terminador. Sendo assim, a mistura de zonas da amostra permanece entre o eletrólito líder e o terminador, sendo estas zonas ordenadas de acordo com a mobilidade (SANTORO, 2000).

## 1.10 Eletroforese Capilar em Gel

Nesta técnica a separação se dá pelo tamanho do soluto que migra através dos poros do capilar que é preenchido com gel. Estes géis devem ter boa estabilidade térmica, tamanho de poros uniforme ( SANTORO, 2000).

Na eletroforese capilar em gel os compostos analisados devem ser carregados uma vez que compostos neutros não migram através do gel devido à supressão do EOF (SANTORO, 2000).

Os compostos geralmente analisados por está técnica são oligonucleotídeos, fragmentos de DNA, além de proteínas.

### **1.11 Eletrocromatografia Capilar**

O capilar é preenchido com uma fase estacionária e a separação ocorre por processos eletroforéticos e interação cromatográfica, como partição, adsorção e permeação em gel por meio de um capilar (SANTORO, 2000).

Diferentemente da cromatografia líquido onde ao fluxo é gerado por a aplicação de pressão, na eletrocromatografia capilar a fase móvel migra após aplicação de um campo elétrico (SANTORO, 2000).

## 2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi o estudo da influência do pH sobre a mobilidade eletroforética de espécies presentes em formulações, a citar: estreptomicina, dihidroestreptomicina, benzalpenicilina, procaína e benzatina, estimando seus valores de pKa e avaliando condições para separação eletroforética destes componentes.

## 3 MÉTODO

### 3.1. Padrões e reagentes

Todas as soluções foram diluídas em água tipo 1 (ou tipo Milli-Q) (Gehaka Ultra System) e o pH corrigido com NaOH ou HCl, conforme a necessidade.

#### ❖ Solução Tampão Borato 50mmol/L

Uma massa de 0,3091g de  $H_3BO_3$  (J.T.BAKER) foi dissolvida em 50mL de água. O pH foi ajustado com NaOH na faixa de 8,0 a 9,5, completando em seguida com água em quantidade suficiente para 100 mL.

#### ❖ Solução Tampão Fosfato 50 mmol/L

Uma massa de 0,3549g de  $Na_2HPO_4$  (J.T.BAKER) foi dissolvida em 50mL de água. O pH foi ajustado com HCl em uma faixa de 6 a 8, completando em seguida com água em quantidade suficiente para 100 mL.

#### ❖ Solução Tampão Carbonato 50 mmol/L

Uma massa de 0,2649g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (J.T.BAKER) foi dissolvida em 50mL de água. O pH foi ajustado com HCl em uma faixa de 8,0 a 9,5, completando em seguida com água em quantidade suficiente para 100 mL.

#### ❖ Solução Tampão Acetato 50 mmol/L

Uma massa de 0,4101g de acetato de sódio foi pesada e dissolvida em 50mL de água. O pH foi ajustado com HCl na faixa de 5,0 a 5,5, completando em seguida com água em quantidade suficiente para 100 mL.

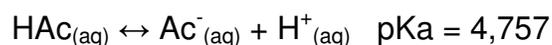
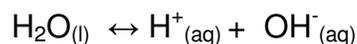
#### Soluções Tampão com força iônica ajustada

Inicialmente, foi calculada a força iônica de cada sistema tampão preparado de acordo com as indicações do item anterior. Para isto as concentrações das espécies em solução foram calculadas a partir dos graus de dissociação e quando necessário do balanço de carga. Os graus de dissociação para cada valor de pH foram calculados com auxílio do software AlfaCalc 1.3

As soluções tampão foram preparadas de modo que a força iônica final das soluções, mediante adição de NaCl, fosse igual a 50 mmol/L.

#### ❖ Solução Tampão Acetato de Sódio 50 mmol/L com força iônica ajustada

Com o ajuste da solução acetato de sódio com ácido clorídrico, as espécies presentes nessa solução são ácido acético (HAc), acetato ( $\text{A}^-$ ), próton, sódio, cloreto e hidroxila. Assim, as equações de equilíbrio são:



$$\text{Onde } [\text{HA}] = \alpha_0 C_a \quad \text{e} \quad [\text{A}^-] = \alpha_1 C_a$$

A concentração de cloreto é calculada através do balanço de carga:

$$[\text{Cl}^-] = [\text{Na}^+] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] - [\text{A}^-]$$

$$[\text{Cl}^-] = C_a + 10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} - \alpha_1 C_a$$

$$[\text{Cl}^-] = C_a (1 - \alpha_1) + 10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)}$$

A força iônica inicial do tampão é calculada através de

$$I = \frac{1}{2} (10^{-\text{pH}} + 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} + (1 + \alpha_1) C_a + [\text{Cl}^-])$$

Substituindo-se a expressão determinada para  $[\text{Cl}^-]$  e fazendo-se as devidas simplificações, a expressão geral para cálculo da força iônica inicial, no tampão acetato 50 mmol/L, assume a forma geral

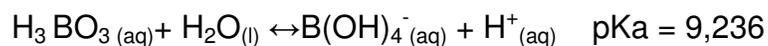
$$I = (10^{-\text{pH}} + C_a)$$

Neste sistema tampão, portanto, considerou-se que em cada valor de pH a força iônica  $I$  foi numericamente igual ao valor da concentração analítica do tampão, não sendo necessária a adição de NaCl.

#### ❖ Solução Tampão Borato 50 mmol/L com força iônica ajustada

A solução foi formada pela adição de ácido bórico e ajuste do pH com NaOH. Assim, as espécies em solução são:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ,  $\text{OH}^-$ ;  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ .

Desta maneira, as equações de equilíbrio são:



$$\text{Onde } [\text{B}(\text{OH})_4^-] = \alpha_1 C_a$$

A concentração de íons sódio é calculada através do balanço de carga:

$$[\text{Na}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{B}(\text{OH})_4^-] - [\text{H}^+]$$

$$[\text{Na}^+] = 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} + \alpha_1 C_a + 10^{-\text{pH}}$$

A força iônica inicial do tampão é calculada através de

$$I = \frac{1}{2} (10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} + 10^{-\text{pH}} + \alpha_1 C_a + [\text{Na}^+])$$

Substituindo-se a expressão determinada para  $[\text{Na}^+]$  e fazendo-se as devidas simplificações, a expressão para cálculo da força iônica inicial, neste caso, assume a forma geral

$$I = (10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} + \alpha_1 C_a)$$

Na Tabela 5, são apresentados os valores de massa de NaCl expressos em g empregados para o ajuste da força iônica em 0,05 mol/L em cada valor de pH do sistema tampão.

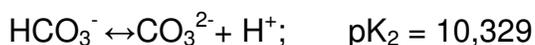
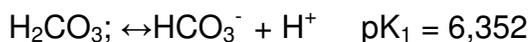
**Tabela 5:** Valores de força iônica inicial do tampão borato 50 mmol/l em diversos valores de pH e valores de massa de NaCl adicionados para ajuste final da força iônica. Fonte (do autor)

PH	$\alpha_1$	$I_{\text{calc}} / (\text{mol/L})$	massa de NaCl Volume de		$I_{\text{final}} / (\text{mol/L})$
			adicionada/g	solução/ mL	
8	0,05490	0,0027	0,2762	100	0,05
8,5	0,15520	0,0078	0,2468	100	0,05
9	0,36740	0,0184	0,1848	100	0,05
9,5	0,64750	0,0324	0,1028	100	0,05
10	0,85310	0,0428	0,0423	100	0,05
10,5	0,94840	0,0477	0,0132	100	0,05
11	0,98310	0,0502	0	100	0,05

❖ **Solução Tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  23,5 mmol/ L com força iônica ajustada**

Esta solução tampão foi preparada pela dissolução de carbonato de sódio e ajuste do pH com ácido clorídrico. Assim, as espécies formadas em solução foram:  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ;  $\text{HCO}_3^-$ ;  $\text{CO}_3^{2-}$ ;  $\text{H}^+$ ;  $\text{OH}^-$ ;  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$

Consequentemente, as equações de equilíbrio são :



$$\text{Onde } [\text{HCO}_3^-] = \alpha_1 C_a \text{ e } [\text{CO}_3^{2-}] = \alpha_2 C_a$$

A concentração de cloreto é calculada através do balanço de carga:

$$[\text{Cl}^-] = [\text{Na}^+] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] - [\text{HCO}_3^-] - 2 [\text{CO}_3^{2-}]$$

$$[\text{Cl}^-] = 2C_a + 10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} - \alpha_1 C_a - 2 \alpha_2 C_a$$

$$[\text{Cl}^-] = C_a (2 - \alpha_1 - 2 \alpha_2) + 10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)}$$

A força iônica inicial do tampão é calculada através de

$$I = \frac{1}{2} (10^{-\text{pH}} + 10^{(\text{pH}-\text{pK}_w)} + \alpha_1 C_a + 4\alpha_2 C_a + 2 C_a + [\text{Cl}^-])$$

A expressão geral para cálculo da força iônica inicial, neste caso, assume a forma geral:

$$I = 10^{-\text{pH}} + C_a(\alpha_2 + 2);$$

Na Tabela 6, são apresentados os valores de massa de NaCl expressos em g empregados para o ajuste da força iônica em 0,05 mol/L em cada valor de pH do sistema tampão.

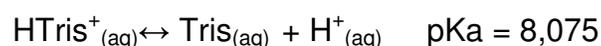
**Tabela 6:** Valores de força iônica inicial do tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  23,5 mmol/l em diversos valores de pH e valores de massa de NaCl adicionados para ajuste final da força iônica. Fonte: (do autor)

pH	$\alpha_1$	$I_{\text{calc}} / (\text{mol/L})$	massa de NaCl		$I_{\text{final}} / (\text{mol/L})$
			adicionada/g	Volume de solução/ mL	
8	0,00456	0,0471	0,0169	100	0,05
8,5	0,01451	0,0473	0,0155	100	0,05
9	0,04469	0,0481	0,0114	100	0,05
9,5	0,12903	0,0500	0,0000	100	0,05

### ❖ Solução Tampão Tris $C_a = 50 \text{ mmol/L}$

A solução foi preparada pela adição de ácido clorídrico sobre o TRIS (trishidroximetil aminometano  $-(\text{COH})_3\text{CNH}_2$ ) na forma desprotonada. Assim, espécies em solução  $(\text{COH})_3\text{CNH}_3^+$  ou  $\text{HTris}^+$ ;  $\text{Tris}$ ;  $\text{H}^+$ ;  $\text{OH}^-$ ;  $\text{Cl}^-$

Desta maneira, as equações de equilíbrio são :



$$\text{Onde } [\text{Tris}] = \alpha_1 C_a$$

A concentração de cloreto é calculada através do balanço de carga:

$$[\text{Cl}^-] = [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] + [\text{HTris}^+]$$

$$[\text{Cl}^-] = 10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH}-\text{pKw})} + \alpha_0 C_a$$

A força iônica inicial do tampão é calculada através de

$$I = \frac{1}{2} (10^{-\text{pH}} + 10^{(\text{pH}-\text{pKw})} + \alpha_0 C_a + [\text{Cl}^-])$$

Podendo ser resumida na forma geral

$$I = 10^{-\text{pH}} + \alpha_0 C_a$$

Na Tabela 7, são apresentados os valores de massa de NaCl expressos em g empregados para o ajuste da força iônica em 0,05 mol/L em cada valor de pH do sistema tampão.

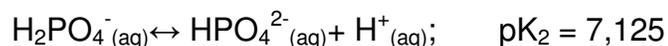
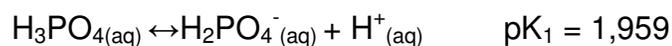
**Tabela 7:** Valores de força iônica inicial do tampão Tris 50 mmol/L em diversos valores de pH e valores de massa de NaCl adicionados para ajuste final da força iônica. Fonte: do autor

pH	$\alpha_1$	$I_{\text{calc}} / (\text{mol/L})$	massa de NaCl		$I_{\text{final}} / (\text{mol/L})$
			Volumede adicionada/g	solução/ mL	
8	0,54310	0,0272	0,1335	100	0,05

8,5	0,27320	0,0137	0,2124	100	0,05
9	0,10620	0,0053	0,2612	100	0,05
9,5	0,03620	0,0018	0,0000	100	0,05
10	0,01170	0,0006	0,0000	100	0,05
10,5	0,00370	0,0002	0,0000	100	0,05
11	0,00120	0,0001	0,0000	100	0,05

### ❖ Solução Tampão Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mmol/L

Com a adição do Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e ajuste do pH com ácido clorídrico, as espécies em solução foram H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>; H<sup>+</sup>; OH<sup>-</sup>; Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Desta maneira, as equações de equilíbrio são :



Onde  $[\text{H}_2\text{PO}_4^-] = \alpha_1 C_a$ ;  $[\text{HPO}_4^{2-}] = \alpha_2 C_a$  e  $[\text{PO}_4^{3-}] = \alpha_3 C_a$

A concentração de cloreto é calculada através do balanço de carga:

$$[\text{Cl}^-] = [\text{Na}^+] + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] - [\text{H}_2\text{PO}_4^-] - 2 [\text{HPO}_4^{2-}] - 3[\text{PO}_4^{3-}]$$

$$[\text{Cl}^-] = C_a (2 - \alpha_1 - 2 \alpha_2 - 3 \alpha_3) + 10^{-\text{pH}} - 10^{(\text{pH} - \text{pK}_w)}$$

A força iônica inicial do tampão é calculada através de

$$I = \frac{1}{2} (2C_a + 10^{-\text{pH}} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_w)} + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] + 4 [\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{PO}_4^{3-}] + [\text{Cl}^-])$$

Substituindo-se a expressão determinada para [Cl<sup>-</sup>] e fazendo-se as devidas simplificações, a expressão geral para cálculo da força iônica inicial, neste caso, assume a forma geral

$$I = (2 C_a + 10^{-\text{pH}} + \alpha_2 C_a + 3 \alpha_3 C_a)$$

Na Tabela 8, são apresentados os valores de massa de NaCl expressos em g empregados para o ajuste da força iônica em 0,05 mol/L em cada valor de pH do sistema tampão.

**Tabela 8:** Valores de força iônica inicial do tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mmol/L em diversos valores de pH. Fonte: (do autor)

pH	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	I/(mol/L)
6	0,9302	0,06980	0,0000	0,1035
6,5	0,8083	0,19170	0,0000	0,1096
7	0,5715	0,42850	0,0000	0,1214
7,5	0,2966	0,70340	0,0000	0,1352
8	0,1177	0,88230	0,0001	0,1441

## OUTRAS SOLUÇÕES

- ❖ Solução estoque de orto – toluidina  $9,3 \cdot 10^{-3}$  mol/L

Um volume de 11  $\mu\text{L}$  de solução concentrada de orto-toluidina (9,33 mol/L) foi diluído em 10 mL de água. O pH obtido foi de 6,91.

## SOLUÇÃO PADRÃO

### ❖ Solução Estoque de Estreptomicina (STR) 1000 mg/L

Uma massa de 0,025g de sulfato de estreptomicina (Aldrich) foi diluída em água quantidade suficiente para 25 mL.

### ❖ Solução Estoque de Benzetacil® 600.000UI/L

Um volume de 4 mL da suspensão de benzetacil (Tabela 9) foi diluído em água, mantido em agitação e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL seu volume completado com água. A solução foi filtrada a vácuo em uma membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenada em frasco âmbar.

**Tabela 9** : Componentes presentes na solução estoque de benzetacil e suas respectivas concentrações. Fonte: (do autor)

Componente	Concentração
Benzatina	352.900UI/g
Penicilina G	705.900UI/g

### ❖ Solução Estoque de Despacilina 400.000 UI/L

Um frasco ampola de 2 mL de Despacilina (Tabela 10) foi diluído em água, mantido em agitação e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de

100mL seu volume completado com água. A solução foi filtrada e armazenada em frasco âmbar a 4°C.

**Tabela 10:** Componentes presentes na solução estoque de despacilina concentrações. Fonte: (do autor)

Componente	Concentração
Procaína	352.900UI/g
Penicilina G	705.900UI/g

#### ❖ Solução de Agrovat

Um volume de 315µL de Agrovat Plus (Novartis) (Tabela 11) foi diluído em água, mantido em agitação e transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL seu volume completado com água. A solução foi filtrada e armazenada em frasco âmbar a 4°C.

Devido à não-solubilização do piroxicam presente na formulação, houve a necessidade de filtração.

**Tabela 11 :** Componentes presentes na solução estoque de Agrovat e suas respectivas concentrações. Fonte: (do autor)

Componente	Concentração
Procaína	352.900UI/g
Dihidroestreptomicina	80g/L
Piroxican	6g/L
Penicilina G	705.900UI/g

#### ❖ Solução Estoque de Pentabiótico com adição de padrão de benzatina

Uma massa de 0,0425 de pentabiótico foi diluída em 25mL de solução estoque de benzatina 600.000 UI/L (Tabela 12).

A solução foi filtrada em membrana de nitrato de celulose 0,45  $\mu$ m de poro.

**Tabela 12** : Descrição dos solutos presentes no pentabiótico e suas concentrações. Fonte: (do autor)

Componente	Concentração
Benzatina	352.900UI/g
Procaína	176.500U/g
Penicilina G	705.900UI/g
Estreptomicina	147,1mg/g
Diidroestreptomicina	2147,1mg/g

#### ❖ Solução Estoque de Pentabiótico com adição de padrão de benzatina e diidroestreptomicina

Uma solução estoque de pentabiótico com adição de padrão de benzatina e diidroestreptomicina foi feita para verificar o sinal das mesmas no eletroferograma.

A solução foi feita pesando uma massa de 0,0425 de pentabiótico e adicionando 79  $\mu$ L de diidroestreptomicina concentrada. Em seguida foi feita uma diluição em 25 mL de benzatina a uma concentração de 600.000U/100mL.

## PROCEDIMENTO

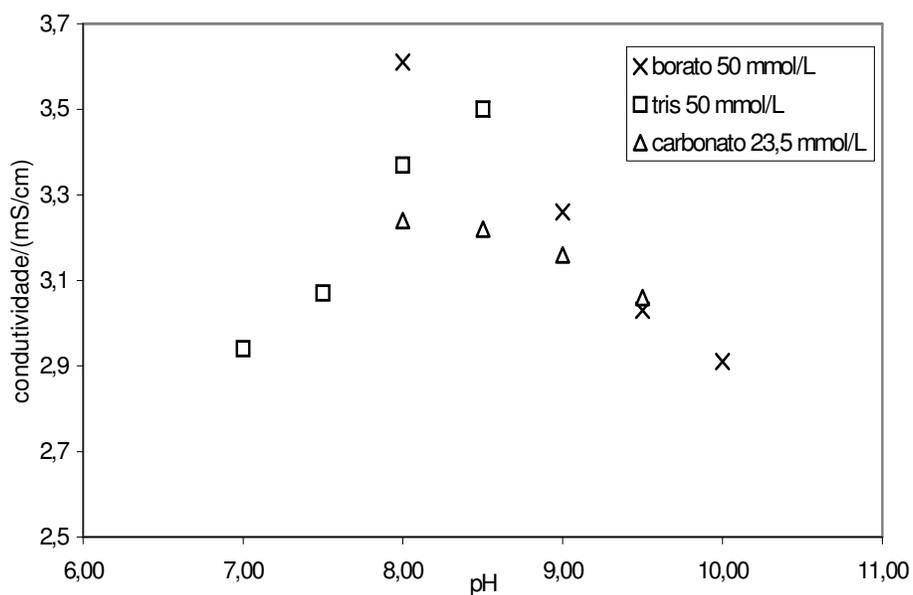
As medidas de condutividade e de pH foram realizadas em um pHmetro - condutímetro Denver 220 com célula condutivimétrica de 4 eletrodos e com eletrodo de vidro combinado, respectivamente.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em estação de eletroforese capilar P/ACE-MQD com detectores espectrofotométricos diode array (PDA) e por filtro. Espectros foram obtidos em um espectrofotômetro UV-visível Diode Array- Agilent 8453A. Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro), com diâmetro interno de 50  $\mu\text{m}$ , externo de 375  $\mu\text{m}$ , com capilar de 60 cm com janela para o detector a 49,5 cm da extremidade. O método utilizado para estas análises foi de tensão constante de 15 kV por um tempo de 20 minutos.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

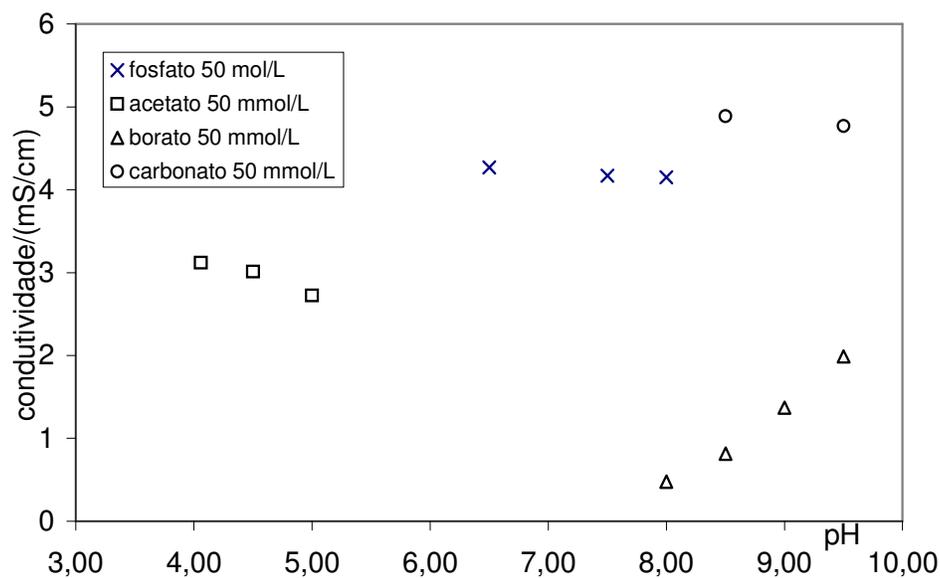
### **4.1 Estudo da dependência da condutividade do tampão em relação ao pH e a força iônica do meio**

Para a seleção dos sistemas tampão, estudou-se a condutividade dos tampões acetato, borato, bicarbonato, tris e fosfato tanto em soluções de força iônica controlada e sem ajuste da força iônica.



**Figura 4:** Variação da condutividade das soluções tampão borato, tris e carbonato em função de pH, em meio de força iônica constante  $I=0,05$  mol/L; temperatura igual  $25^{\circ}\text{C}$   
Fonte: (do autor)

Nas Figuras 4 e 5 são apresentados respectivamente, os valores medidos de condutividade elétrica em função do pH para os sistemas tampão estudados sem ajuste de força iônica e com ajuste de força iônica.



**Figura 5:** Variação da condutividade das soluções tampão fosfato, acetato, borato e carbonato em função de pH, sem ajuste de força iônica; temperatura igual a 25 °C  
 Fonte: (do autor)

A diferença de comportamento do tampão borato em meio com e sem ajuste da força iônica é devido à maior concentração de cloreto nos valores de pH em que a concentração do borato é menor (pois é menor seu  $\alpha_1$ ). A solução de acetato, por sua vez tem a força iônica ajustada em todos os valores de pH, sem a necessidade da adição de cloreto de sódio.

A condutividade elétrica molar de uma solução ( $\Lambda$ ) é a soma das condutividades molares dos íons  $i$  ( $\lambda_i$ ), que, por sua vez dependem da condutividade molar a diluição infinita ( $\lambda_i^0$ ) para aquela força iônica e da concentração no equilíbrio (Equação 4.1)

$$\Lambda = \sum z_i \lambda_i [i] = \sum z_i \lambda_i^0 \cdot \alpha_i C \quad (4.1)$$

Assim, com a variação de pH do meio, variam apenas o grau de distribuição da espécie e a concentração do contra-íon (a do próton e hidroxila são considerados desprezíveis).

Desta maneira, pode-se considerar que a condutividade elétrica ( $\Lambda$ ) da solução tampão é função do pH do meio através da Equação 4.2

$$\kappa = \kappa_B + \kappa_o(B(OH)_4^-) \cdot \alpha_1 \quad (4.2)$$

Onde  $\kappa_B$  é a condutividade elétrica devido à presença dos outros íons, que não sofrem influência do pH e  $\kappa_0$  é a condutividade elétrica do borato. O grau de dissociação  $\alpha_1$  para um sistema monoprótico é função apenas do pH e pKa, conforme apresentado na Equação 4.3.

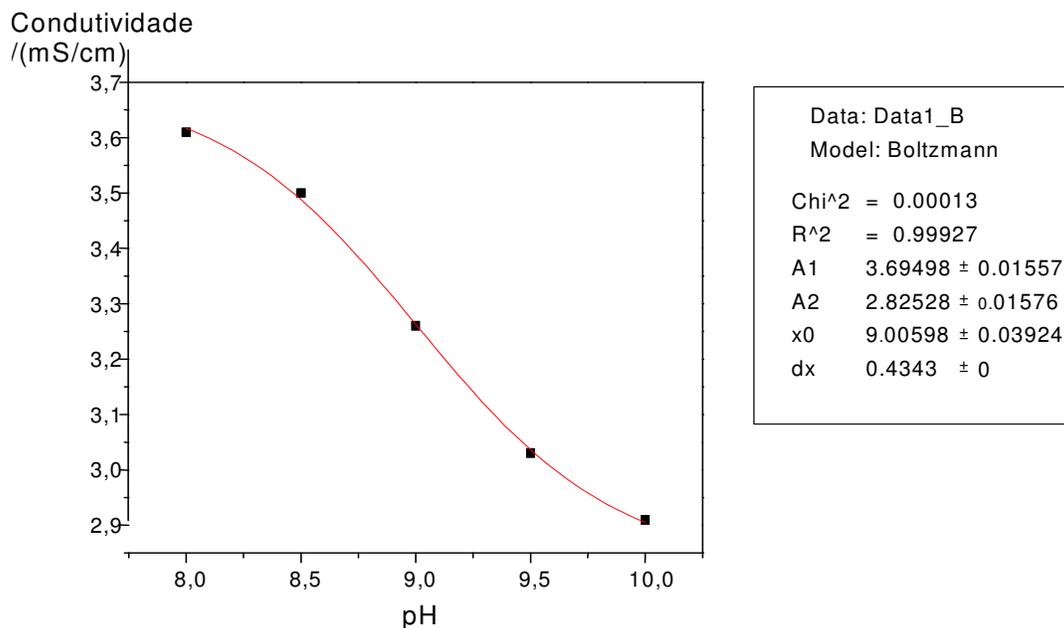
$$\alpha_o = \frac{1}{(1+10^{(pH-pKa)})} \quad (4.3)$$

O gráfico do comportamento da condutividade em função do pH é apresentado na Figura 4.3. Foi aplicado, com auxílio do software Origin 6.0, um modelo não-linear da sigmóide de Boltzmann, descrita na Equação 4.4.

$$y = \frac{(A_1 - A_2)}{(1 + e^{(x-x_0)/dx})} + A_2 \quad (4.4)$$

Comparando-se a Equação 4.4 com as Equações 4.2 e 4.3, observa-se que a diferença entre os termos  $A_1$  e  $A_2$  é igual à condutividade do borato ( $\lambda_0$ ), enquanto que o segundo termo é igual ao termo  $\Lambda_B$ , isto é, a condutividade da solução na condição em que o grau de dissociação do ácido bórico é igual a 1. O expoente  $x_0$  é igual ao pKa e o termo  $dx$  igual a  $1/\ln(10)$ , para converter a base neperiana em decimal (0,43429).

Mantendo o valor da variável  $dx$  fixo durante a otimização da função, o pKa obtido foi igual a  $9,01 \pm 0,04$ .



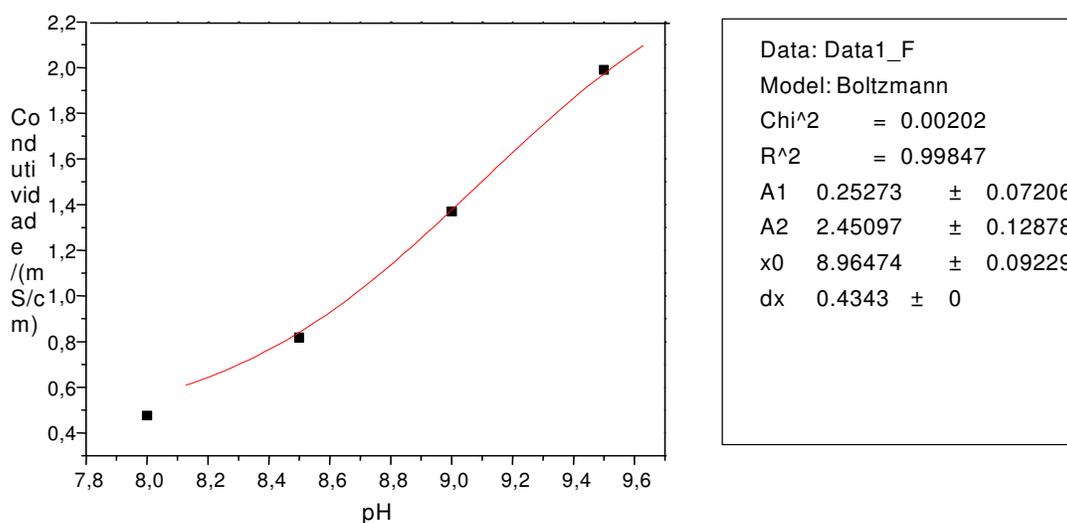
**Figura 6:** Comportamento da condutividade do tampão borato em diversos valores de pH, com força iônica ajustada para 50 mmol/L. Ajuste com a Sigmóide de Boltzmann  
Fonte: (do autor)

O valor da condutividade elétrica ( $\kappa$ ) do borato foi de 0,867 mS/cm, sendo, portanto, sua condutividade molar ( $\lambda$ ) igual a 17,394 Scm<sup>2</sup>/mol, que é um valor baixo, comparado com ânions tais como cloreto (76,4 Scm<sup>2</sup>/mol) ou benzoato (32,4 Scm<sup>2</sup>/mol).

Para o sistema sem ajuste da força iônica, cujo comportamento foi oposto àquele observado para o sistema com força iônica ajustada, obteve-se um pKa igual a 8,96 ± 0,09, ou seja, devido ao erro, não é possível distinguir a influência da força iônica sobre esse parâmetro, embora esse valor seja menos confiável uma vez que nesse caso, a força iônica do meio é função do pH.

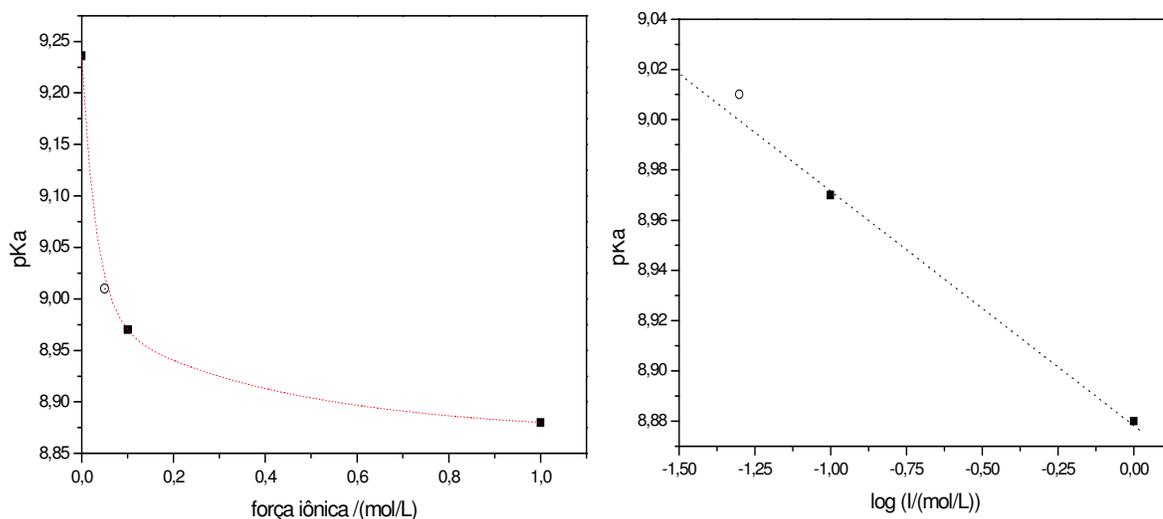
Considerando-se, por outro lado, a influência da força iônica sobre a constante de acidez (Equação 4.5) observa-se que o valor do pKa deve estar ao redor de 9,147, o que implica que o valor obtido por esse método é bastante adequado, com diferença de 1,43% (Kotrly, 1985).

$$\Delta pKa = \frac{-0,509 \cdot \Delta z^2 \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} \quad (4.5)$$



**Figura 7:** Comportamento da condutividade do tampão borato em diversos valores de pH, sem ajuste da força iônica. Ajuste com sigmoide de Boltzmann Fonte: (do autor)

Por outro lado, a partir dos valores de pKa em outras forças iônicas, é possível observar que o valor encontrado nesse trabalho têm um comportamento adequado (Figura 8), ainda que o número de valores de pKa disponíveis seja pequeno.

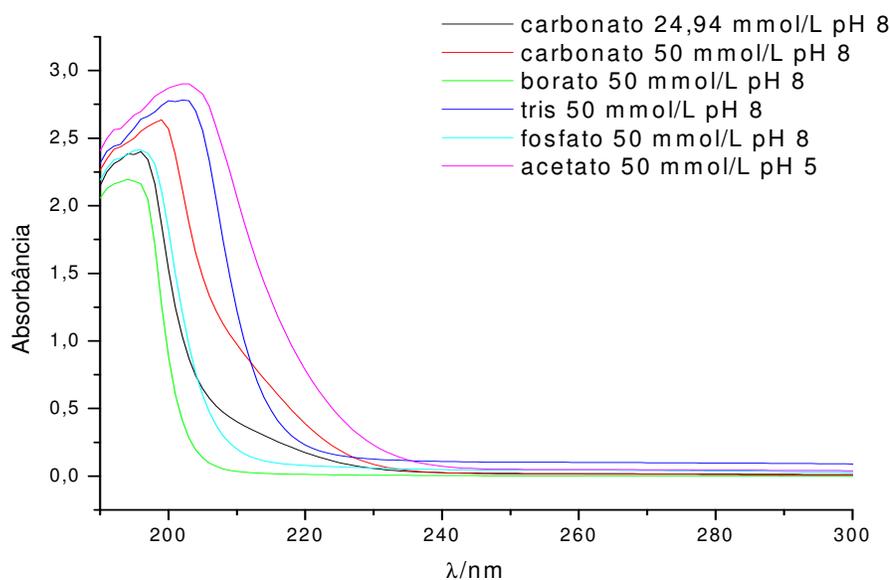


**Figura 8:** Estimativa do pKa do ácido bórico em força iônica 0,05 mol/L baseado na interpolação da força iônica. O círculo vazado é o valor obtido nesse trabalho. Fonte: (do autor)

A função não-linear utilizada, portanto, é bastante conveniente para a estimativa do pKa do sistema, pois não exige a obtenção de valores de resposta em toda a faixa de pH onde ocorre a variação do grau de dissociação, além das regiões onde os graus de dissociação são constantes, como ocorre com métodos de linearização.

## 4.2 Espectros de absorção dos sistemas tampão na região do ultravioleta

Foram obtidos os espectros das soluções tampão utilizadas. Observa-se que todos os compostos absorvem fortemente na região abaixo de 220 nm. Dentre eles, o borato apresenta uma banda de absorção mais estreita e em comprimentos de onda menores. O inconveniente dessas absorções é a saturação do detector, aumentando o ruído na detecção de baixos valores de absorbância nesses comprimentos de onda menores, o que é crítico para a determinação de estreptomicina e dihidroestreptomicina.



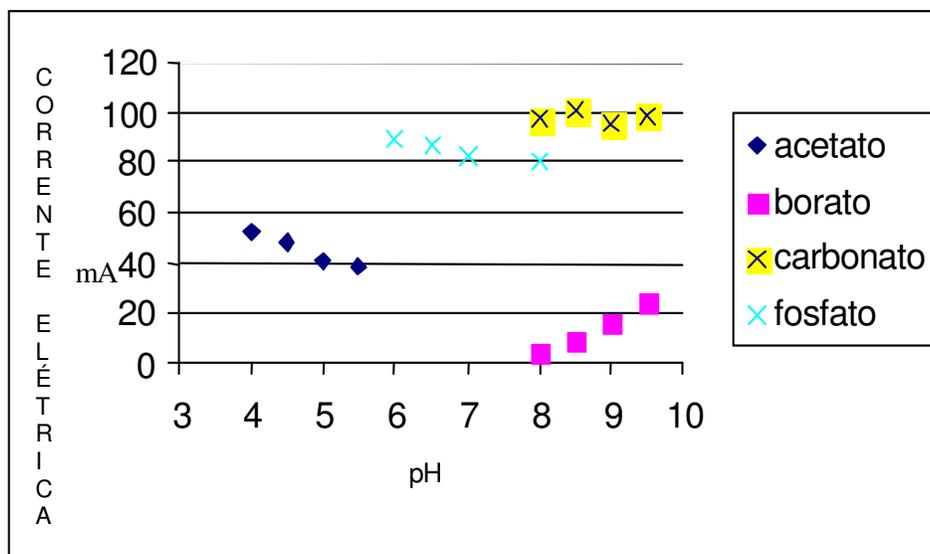
**Figura 9:** Espectros de absorção dos sistemas tampão. Fonte: (do autor)

### 4.3 Estudo da influência do eletrólito sobre a corrente elétrica

Foi analisada a influência de cada sistema tampão utilizado sobre a corrente elétrica.

Pela Equação de Ohm, a condutividade da solução influencia a sua resistência elétrica e, por sua vez, sobre a corrente que migra através da diferença de potencial aplicada. O principal efeito da corrente elétrica em um sistema eletroforético é o aquecimento devido ao efeito Joule, ou seja, aquecimento associado ao movimento de carga.

Assim, foram medidas as correntes elétricas dentro do capilar de trabalho. Foi utilizada uma tensão de 15kV e capilar de 60 cm com diâmetro interno de 50 $\mu$ m.



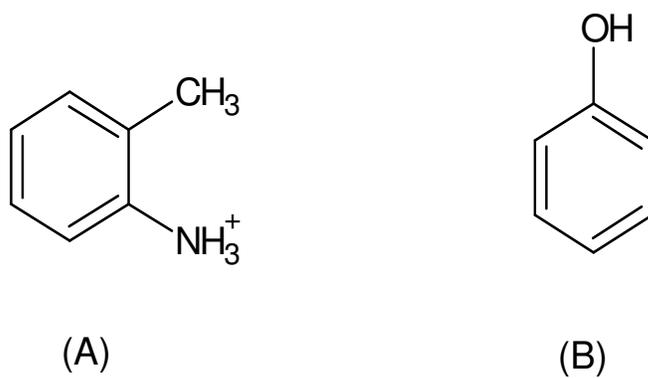
**Figura 10** :Corrente Elétrica em eletroforese capilar de sistemas tampão em função do pH. Tensão elétrica de 15kV e capilar de 60 cm de comprimento e 50 $\mu$ m de diâmetro interno. Fonte: (do autor)

O comportamento da corrente elétrica, como esperado, segue o comportamento da condutividade elétrica, uma vez que, pela lei de Ohm, essas grandezas são proporcionais. Observa-se a corrente elevada para o sistema carbonato e fosfato em relação aos outros dois. Esse comportamento é devido, principalmente às cargas das espécies envolvidas, ou seja, o equilíbrio ácido-base entre um ânion monovalente e um outro divalente para o caso do carbonato e fosfato. Por outro lado, no caso do acetato e ácido bórico, apenas uma espécie monovalente contribui para a corrente. Este resultado explica a vantagem do uso desses últimos sistemas tampão em relação aos primeiros, assim como de outros sistemas monovalentes de grande tamanho, não estudados neste trabalho (CAPS, HEPES, etc.) se o pH de trabalho permitir.

A diminuição da condutividade do tampão acetato com o aumento do pH é devido à maior quantidade de cloreto nas soluções onde a concentração de acetato era menor, pois a quantidade total de ânions se mantém constante nessa solução formada por espécies monovalentes, apenas.

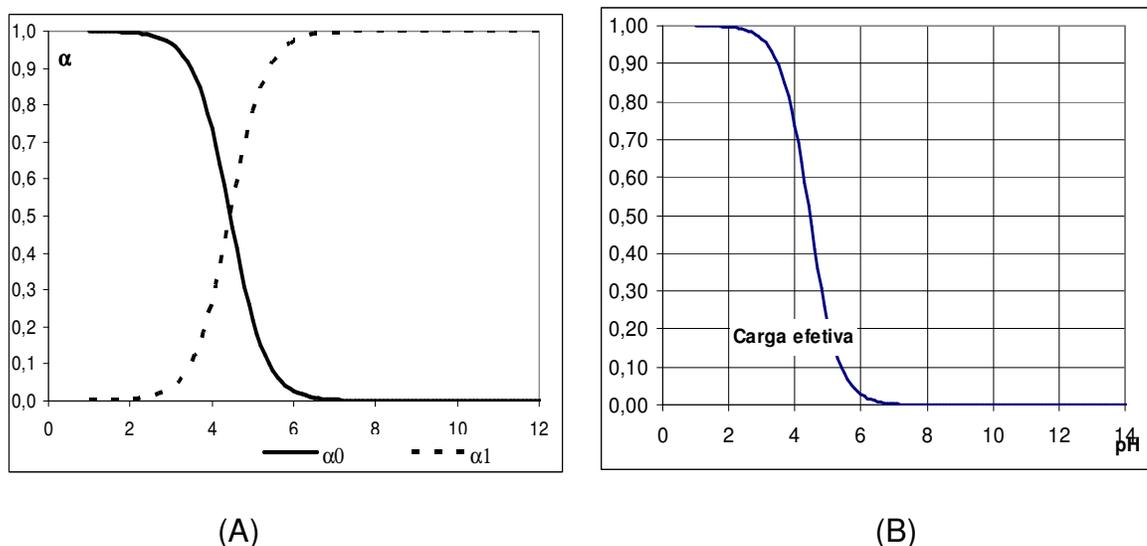
#### 4.4 Seleção do marcador de EOF

Foram selecionados dois marcadores de EOF, a o-toluidina e o fenol (Figura 4.8), ou seja, substâncias neutras que absorvem no UV e são transportados apenas devido ao movimento do fluxo eletroosmótico. Foram selecionados



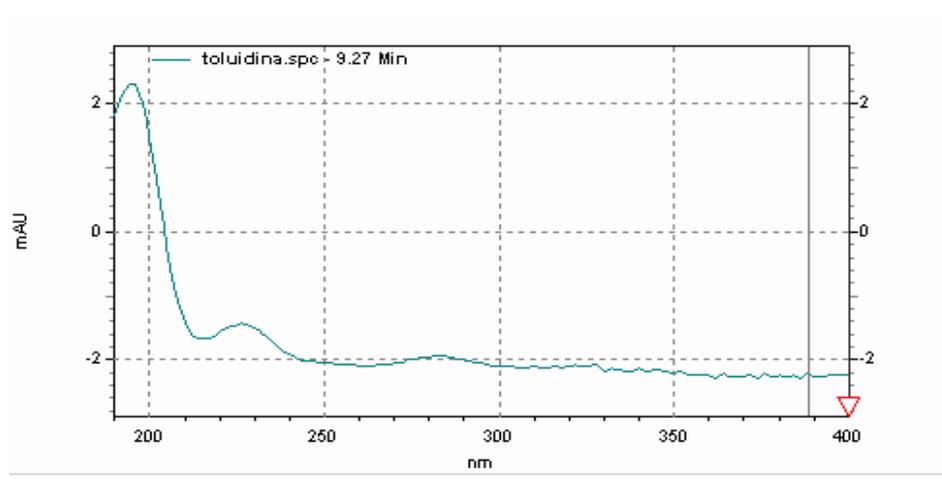
**Figura 11** : Estruturas das espécies totalmente protonadas da (A) o-toluidina e do (B) fenol. Fonte: (do autor)

O pKa da o-toluidina é igual a 4,447 (I=0, 25°C). Devido à presença da amina protonada em concentrações significativas em meios com pH ácidos, como pode ser observado no seu gráfico de distribuição de espécies (Figura 4.9A). Esse composto foi utilizado em soluções com pH acima de 6,5 ( $\% \alpha_0 < 0,88\%$ ), como pode ser observado no seu gráfico de carga efetiva (Figura 4.9B), onde observa-se uma carga assintoticamente próxima de zero a partir desse valor de pH.



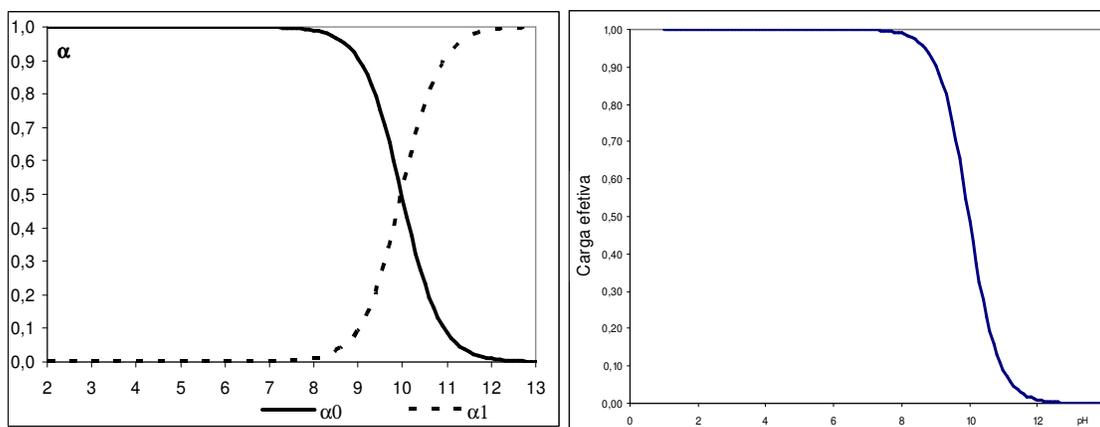
**Figura 12** : Comportamento da o-toluidina em função do pH. (A) curva de distribuição de espécies; (B) carga efetiva Fonte: (do autor)

O espectro na região do UV-visível (Figura 4.10). Observa-se uma banda de absorção intensa em 195 nm.



**Figura 13**: Espectro na região do UV-visível da o-toluidina. Fonte: (do autor)

A base de Bronsted do fenol, cujo pKa é igual 9,98, é a espécie sem o próton da hidroxila, de maneira que sua espécie neutra, o ácido de Bronsted, existe com grau de dissociação virtualmente com valor igual 1,0 em meios com pH menores que 8. Ambos marcadores, fenol e o-toluidina, foram utilizados em uma concentração de  $1.10^{-2}$  mol/L.

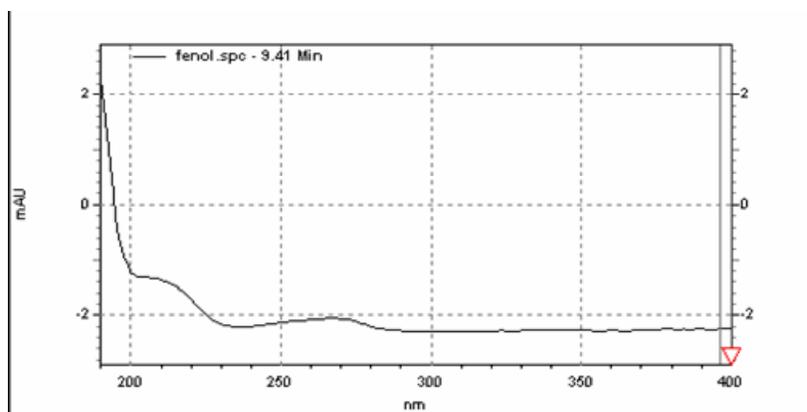


(A)

(B)

**Figura 14** : Comportamento do fenol em função do pH. (A) curva de distribuição de espécies; (B) carga efetiva Fonte: (do autor)

O espectro do fenol em meio ácido, obtido com o PDA da estação de eletroforese capilar com a injeção por pressão ao detector (2 psi), é apresentado na Figura 4.12.



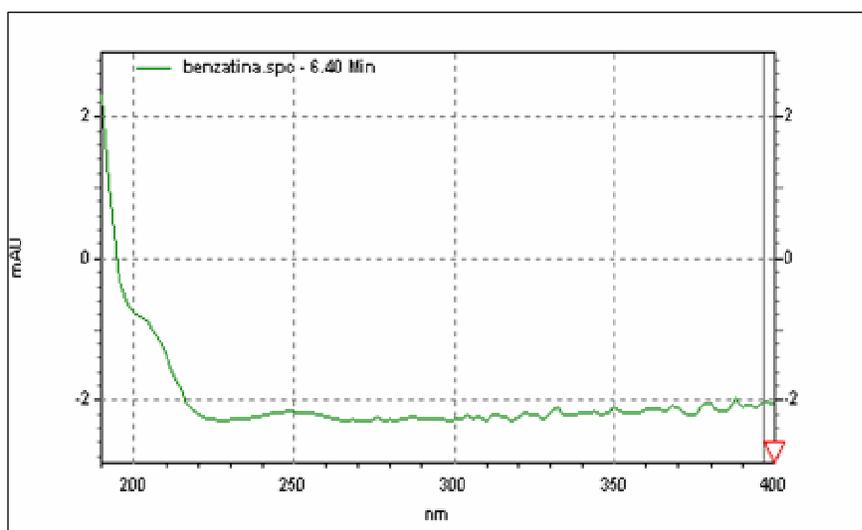
**Figura 15** : Espectro do fenol na região do UV-visível Fonte: (do autor)

## 4.5 Influência do pH sobre a mobilidade eletroforética

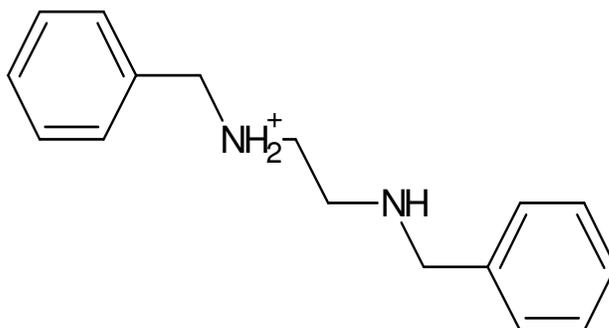
Foram estudadas as mobilidades eletroforéticas dos componentes da mistura pentabiótica de interesse, a citar: benzatina, benzopenicilina; estreptomicina, dihidroestreptomicina e procaína. Em uma primeira etapa sem ajuste da força iônica e em seguida com a força iônica das soluções ajustadas para 50 mmol/L com cloreto de sódio.

### ❖ Benzatina

A benzatina é uma amina secundária, contendo grupos fenólicos, o que lhe confere um máximo de absorção em 190 nm, com um ombro em 205 nm como pode ser observado na Figura 4.13. É um sistema pseudo-monoprótico (devido à simetria da molécula e distância entre os grupos amínicos) cujo íon (o ácido de Bronsted) é positivo (Figura 4.14). Isto significa uma migração em direção ao catodo, forma normal de uso.



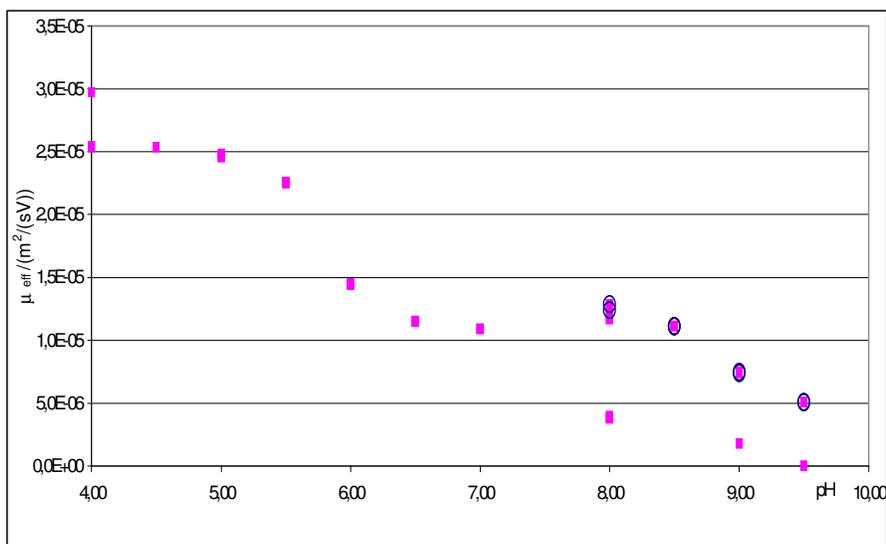
**Figura 16** : Espectro de Absorção da Benzatina na região do ultravioleta do espectro eletromagnético Fonte: (do autor)



**Figura 17** : Estrutura do ácido de Bronsted da benzatina Fonte: (do autor)

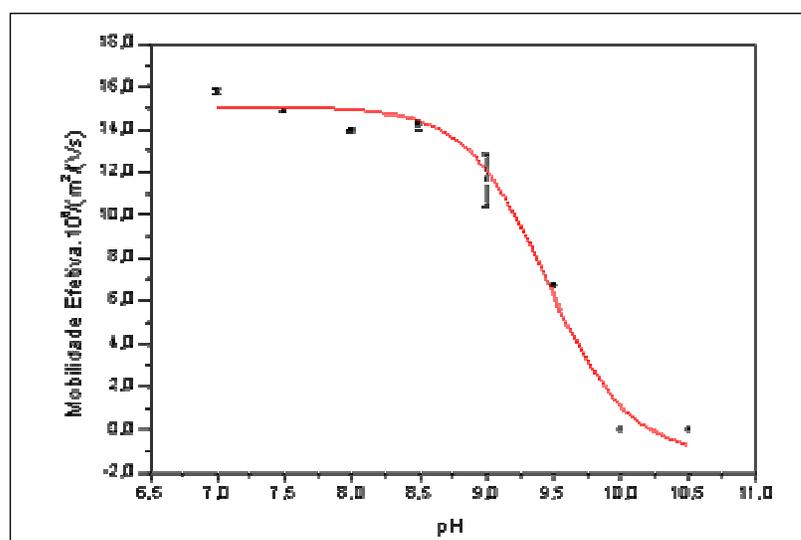
Na Figura 4.15 pode-se observar o comportamento da mobilidade em função do pH em soluções sem o ajuste da força iônica. Observam-se variações na mobilidade do composto que não pode ser explicado pela estrutura do composto. Por exemplo, entre os valores de pH 5 e 6, o grupo amínico apresenta valores de pKa entre 9 e 10, sem haver uma influência acentuada dos anéis aromáticos, uma vez que estão distante do nitrogênio sem formar conjugações. Além disso pode-se observar diferentes comportamentos da mobilidade eletroforética para a mesma região de pH (acima de 8,0), devido ao uso de eletrólitos com força iônica distintas.

Por outro lado, em um estudo com a força iônica corrigida (Figura 4.16), observa-se apenas uma inflexão da mobilidade eletroforética efetiva. Observa-se a diminuição do seu valor a partir de  $(1,465 \pm 0,003) \cdot 10^{-5} \text{ m}^2/\text{Vs}$ , valor da mobilidade real do cátion para valores de pH menores que 8,5 até a mobilidade nula, devido à presença de virtualmente, apenas a espécie neutra. Vale lembrar que este valor de mobilidade já está desconsiderando a mobilidade do fluxo eletrosmótico (EOF).



**Figura 18** : Comportamento da mobilidade efetiva da benzatina em função do pH do eletrólito em meio com força iônica não controlada. Os pontos circulados foram obtidos em tampão borato. (abaixo) Estrutura da benzatina na forma protonada Fonte: (do autor)

Utilizando o método não-linear para ajuste da Sigmoide de Boltzmann, conforme apresentado anteriormente, pode-se calcular a mobilidade real do cátion apresentada acima quanto o pKa do composto, igual a  $9,490 \pm 0,002$ . Este valor é bastante coerente com a estrutura do composto, como já discutido.

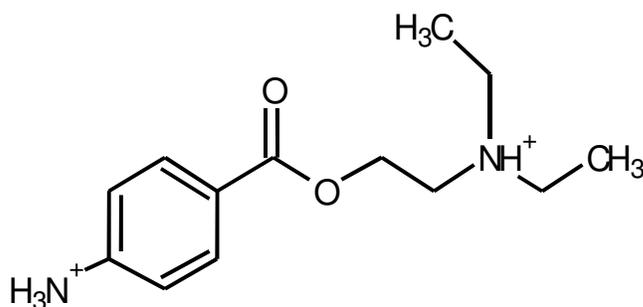


**Figura 19** : Comportamento eletroforético da Benzatina em diferentes valores de pH em meio com força iônica constante Fonte: (do autor)

## ❖ Procaína

A procaína apresenta dois grupos protonáveis, como apresentado na Figura 4.17. Como éster do ácido p-aminobenzóico, o pKa do grupo amínico ligado ao anel aromático deve ser próximo daquele do ácido (igual a 4,87). O pKa da amina alifática ligada ao ácido p-aminobenzóico, por outro lado, deve apresentar um pKa entre 9 e 10.

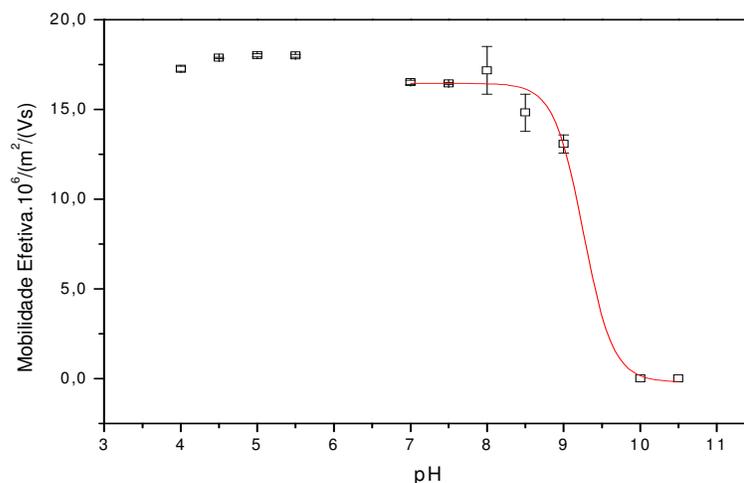
Como pode ser observado na Figura 4.18, não é possível distinguir o primeiro pKa do sistema, ainda que o íon predominante tenha sido alterado daquele com duas cargas positivas para apenas uma na região próxima ao primeiro pKa. Isto pode significar que o pKa desse grupo está mais ácido do que o esperado em valores inferiores a 4,0.



**Figura 20** : Estrutura química da procaína na forma totalmente protonada. Fonte: (do autor)

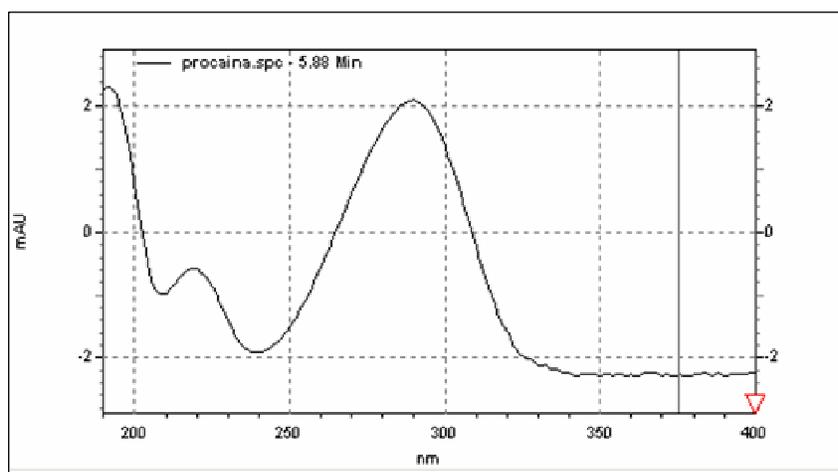
Entretanto, a influência do segundo pKa da procaína sobre a mobilidade eletroforética é bastante acentuada, com valores real de  $(1,645 \pm 0,006) \cdot 10^{-5} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  para a espécie com apenas uma carga positiva.

O valor do pK<sub>2</sub> estimado foi de  $9,44 \pm 0,06$ , que é coerente com as considerações para esse grupo. Além disso, o valor obtido é bastante próximo daquele da benzatina.



**Figura 21** : Mobilidade eletroforética efetiva da procaina. Tensão de 15 kV, força iônica 50 mmol/L. Fonte: (do autor)

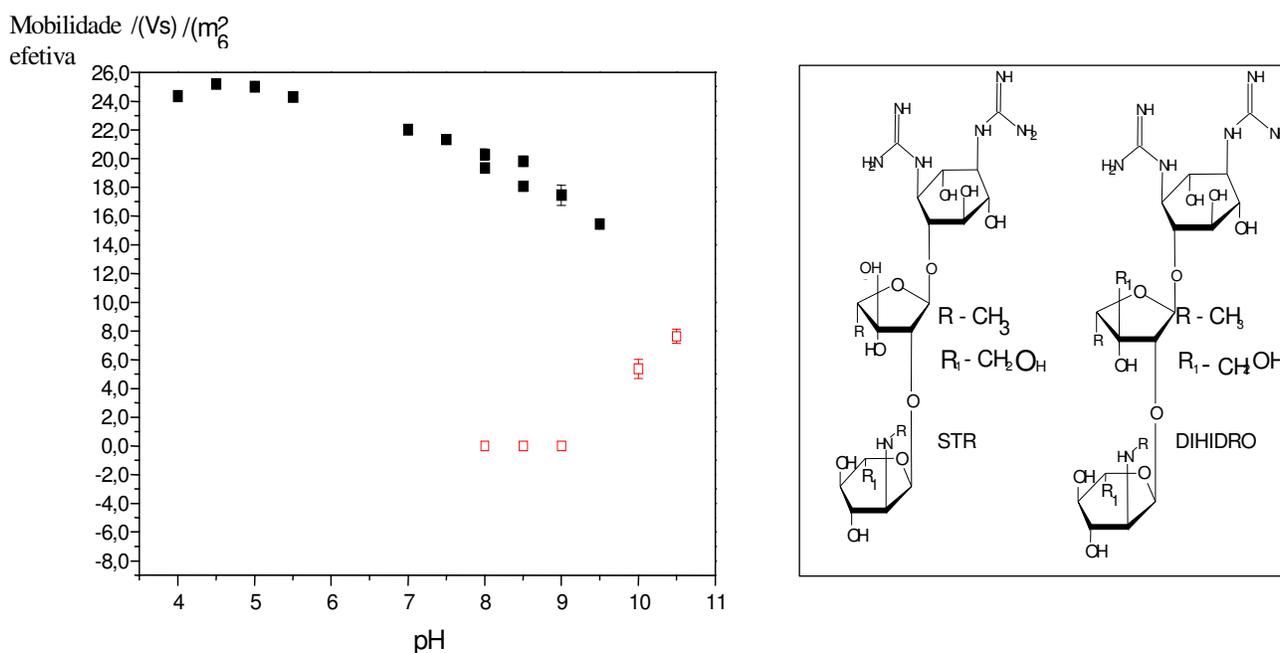
O espectro de absorção da procaina apresenta máximos de absorção em 192 nm, 220nm e 285 nm como pode ser visto na Figura 4.16. Em algumas corridas é possível distinguir um segundo pico com mesmo espectro, estando relacionado à formação do ácido p-aminobenzóico, por hidrólise.



**Figura 22**: Espectro da procaina na região do UV-visível Fonte: (do autor)

## ❖ Estreptomicina

A mobilidade da estreptomicina em função do pH com força iônica constante é apresentada na Figura 4.20A. Diferentemente dos dois sistemas anteriores, não é possível distinguir variações acentuadas relacionadas à variação do grau de dissociação. A presença de mais de um valor de pKa com diferenças entre si menores que 4 unidades pode levar a esse comportamento. Ainda que isoladamente possam ser observados três grupos aceptores de próton na estreptomicina: um grupo amínico cujo pKa usualmente se encontra entre 9 e 11 e dois grupos guanidínicos cujos valores de pKa, encontram-se usualmente acima de 11 (Figura 4.20B). Entretanto, devido à sua rotação livre, observa-se a possibilidade da interação com uma hidroxila formando uma ligação de hidrogênio, aumentando a acidez do próton por reduzir a nuvem eletrônica do nitrogênio, explicando assim, os valores de pKa próximos. Em todo caso, a estreptomicina apresenta uma mobilidade positiva pelo menos para valores abaixo de 9,5.

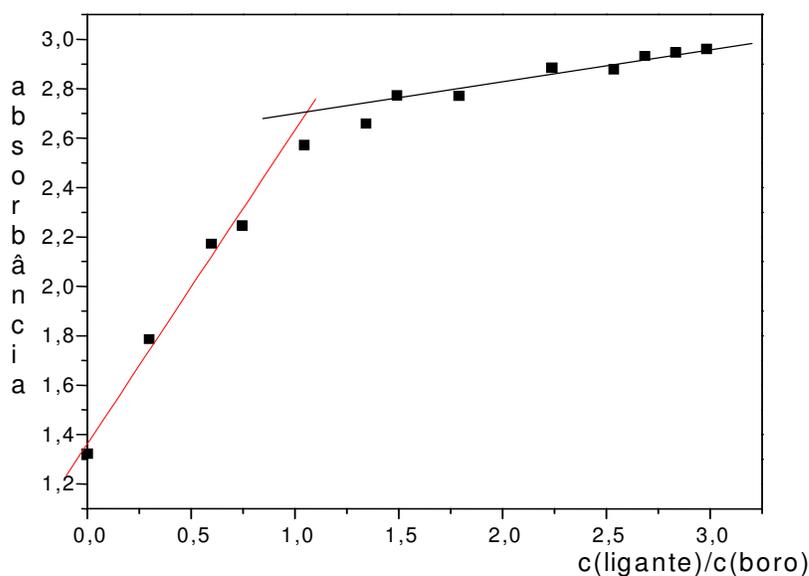


**Figura 23:** (A) Mobilidade Eletroforética da estreptomicina na presença de borato 50 mmol/L; (B) Estrutura da Estreptomicina Fonte: (do autor)

Em tampão borato, onde os açúcares da estreptomicina podem ser complexados pelo boro, observa-se um comportamento diferente. Em pH 8, a formação baixa concentração do complexo com carga negativa compensa a concentração da espécie

positiva, diminuindo a mobilidade efetiva, ou mesmo pela formação de um zwitterion. Com o aumento da concentração de complexo no meio, devido ao aumento do pH do meio, entretanto, observou um comportamento anômalo, onde houve um aumento da mobilidade eletroforética.

Foi avaliada a complexação do boro pela estreptomicina através do método das variações contínuas em pH 10,5. Observa-se que a partir da razão de concentrações de estreptomicina e boro igual a 1,0 há uma alteração da absorbância da solução em 195 nm, sugerindo que todo boro presente no meio foi complexado com a estreptomicina, na razão 1:1, conforme sugerido na literatura.



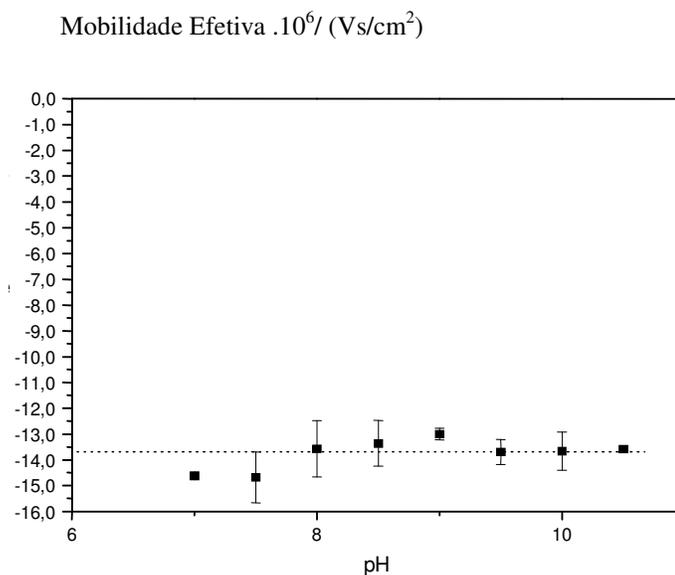
**Figura 24** : Método das Variações Contínuas para o complexo de boro – estreptomicina. Fonte: (do autor)

### ❖ Benzilpenicilina

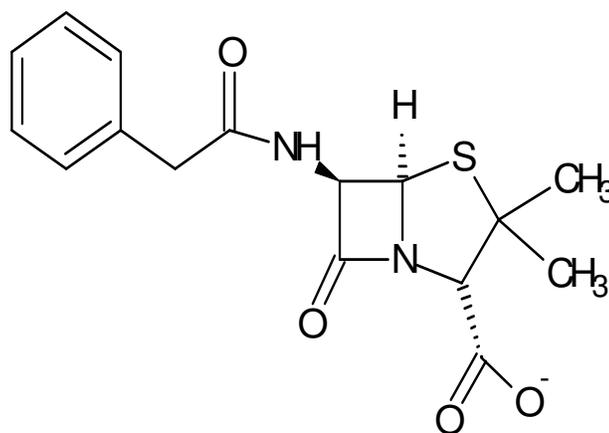
A benzilpenicilina apresentou uma mobilidade efetiva constante em toda faixa de pH

estuda, entre 4,0 e 10, com um valor ao redor de  $(-1,36 \pm 0,01) \cdot 10^{-5} \text{ m}^2/(\text{V.s})$  (Figura 4.22).

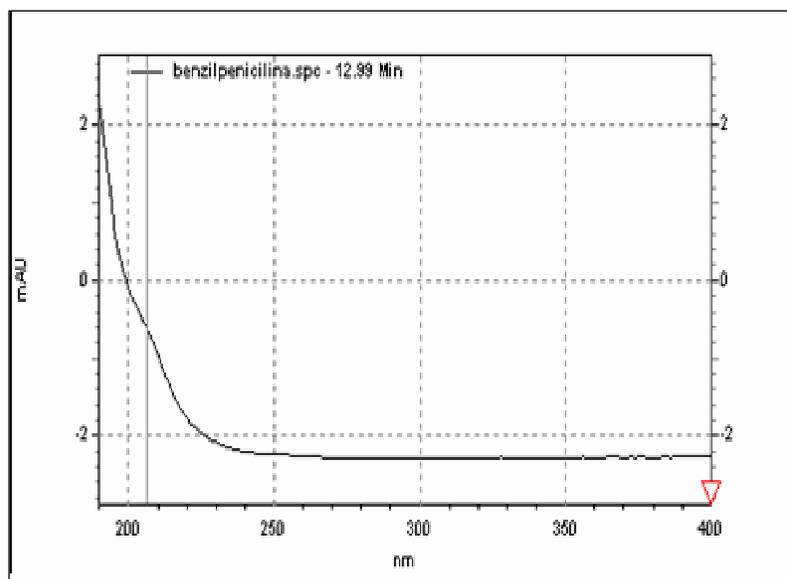
Devido ao pKa do grupo carboxílico (2,76), a benzilpenicilina apresenta uma carga iônica negativa e unitária, constante nesse intervalo de pH, o que explica o comportamento da sua mobilidade aparente.



**Figura 25** : Efeito do pH sobre a mobilidade efetiva da benzilpenicilina Fonte: (do autor)



**Figura 26** : Estrutura da benzilpenicilina Fonte: (do autor)



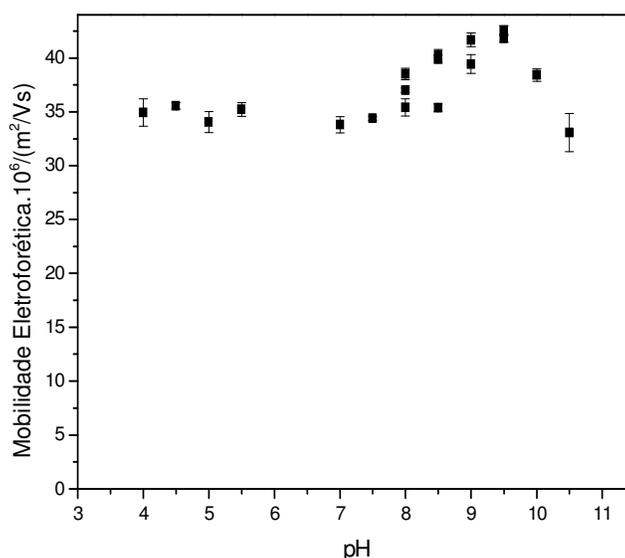
**Figura 27** : Espectro na região do UV-visível para a benzilpenicilina Fonte: (do autor)

## 4.6 Comportamento do EOF

O comportamento do EOF é descrito pela formação de cargas na superfície da sílica devido à desprotonação de grupos silanóis. Entretanto, de acordo com as condições de pré-condicionamento, as condições da superfície, pKa médio, etc. podem variar consideravelmente, assim como os eletrólitos presentes.

A influência do pH sobre o fluxo eletroosmótico (EOF) foi avaliada no intervalo de pH de 4,0 a 10,5 nos diferentes eletrólitos utilizados e é apresentada na Figura 28.

Ainda que seja observada uma grande dispersão é importante lembrar que as mobilidades efetivas são calculadas para cada eletroferograma, com o seu EOF. Assim, essas alterações de EOF entre as medidas são compensadas.



**Figura 28** : Comportamento do EOF em função do pH. Fonte: (do autor)

A sua mobilidade permanece constante ao redor de  $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/(\text{V} \cdot \text{cm})$ . entre valores de pH de 4,0 a 8,9. Observa-se também um aumento do EOF a partir do pH 7,5 que deve estar relacionado com alterações na superfície do capilar. Vale ressaltar que o comportamento do EOF na presença de borato mostrou-se levemente diferenciado dos demais eletrólitos.

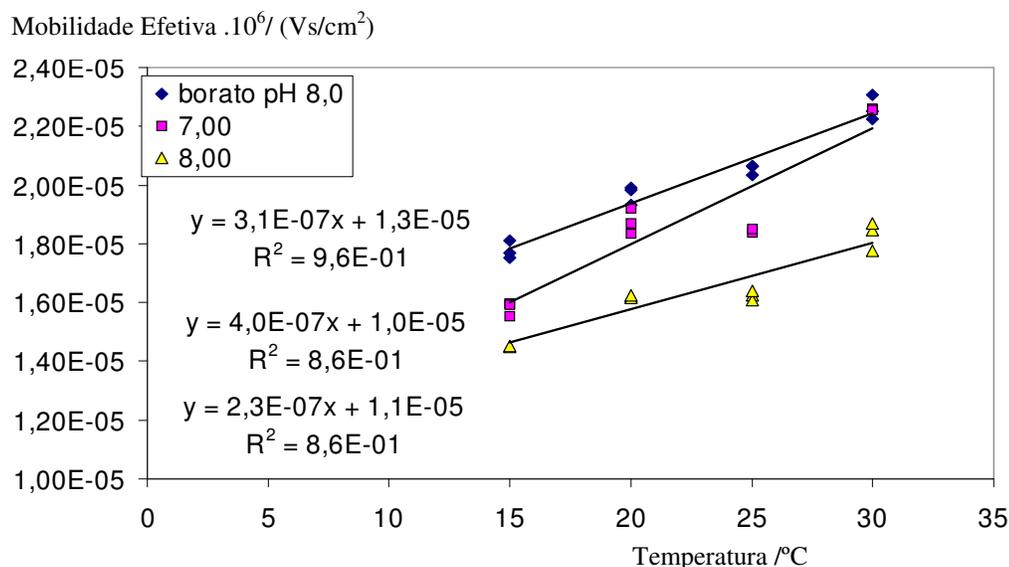
A protonação principal, ou seja, aquela que determina a formação de cargas negativas no capilar gerando então o EOF, entretanto não é observada nesse intervalo de pH.

#### 4.7 Influência da temperatura sobre a mobilidade

A temperatura é uma variável importante em EC, pois influencia diversos parâmetros. Por exemplo, o aumento de temperatura altera a viscosidade e portanto, altera também as mobilidades efetivas, fazendo assim com que cátions e ânions migrem mais rapidamente, além de alterar os valores de pKa, alterando as cargas efetivas dos compostos.

Foi estudado o comportamento dos analitos nas temperaturas de 15°C, 20°C, 25°C e 30°C, em diferentes pH e sistemas tampão.

Na Figura 4.6 observa-se o efeito da temperatura sobre a mobilidade da estreptomicina em em tampão fosfato 50 mol/L nos valores de pH iguais a 7,0 e 8,0 e em tampão Borato 8,0 .

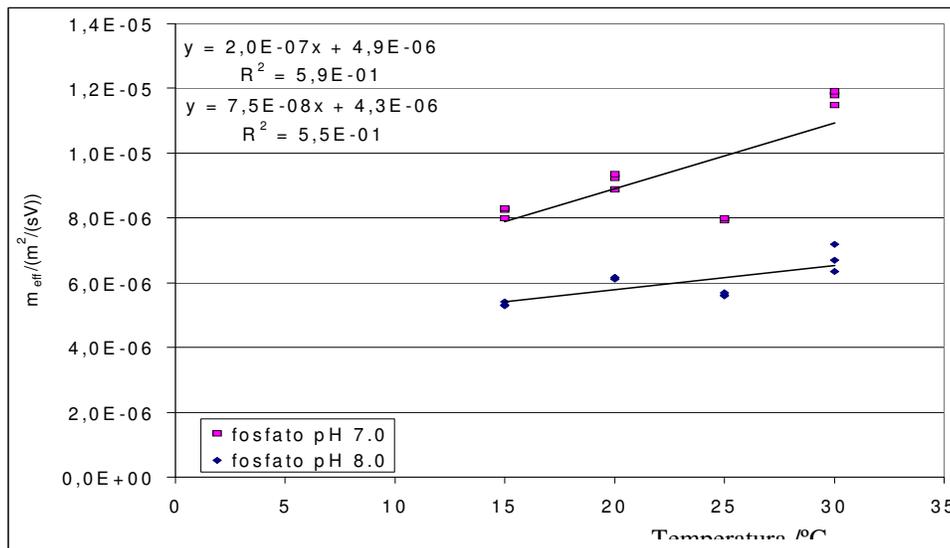


**Figura 29** : Comportamento da mobilidade aparente da estreptomicina em diferentes valores de pH e tipos de sistema tampão Fonte: (do autor)

Observa-se que um comportamento linear entre a mobilidade e a temperatura do meio e que a taxa de elevação da mobilidade em função da temperatura ( $d\mu/dT$ ), para os sistemas estudados , depende do pH do meio e do sistema tampão envolvido.

No estudo da procaína, também foi verificado o comportamento linear e uma menor taxa ( $d\mu/dT$ ) menor para o fosfato em pH 8,0 do que em 7,0.

Ainda que a influência da temperatura sobre a mobilidade eletroforética seja principalmente devido à variação da viscosidade do eletrólito ( $\eta$ ) e portanto, um comportamento exponencial (Eq. 4.2), na prática, tem-se observado um comportamento linear para pequenos intervalos de temperatura em escala Kelvin (KUHN,1993).



**Figura 30:** Comportamento da mobilidade aparente da estreptomicina em diferentes valores de pH e tipos de sistema tampão Fonte: (do autor)

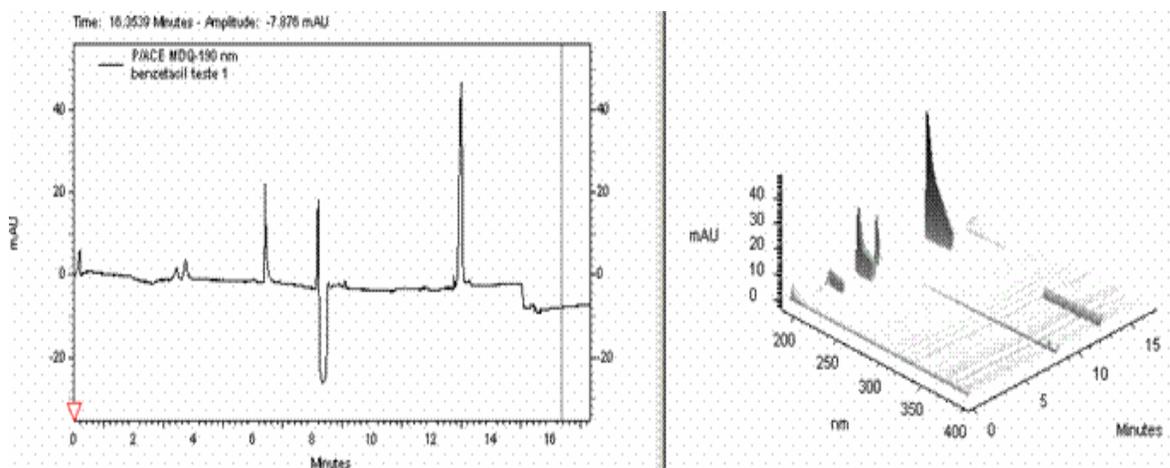
Além disso, a temperatura também influencia as constantes de equilíbrio, tanto das espécies em solução quanto das paredes do capilar, de maneira que a mobilidade em diferentes valores de pH têm diferentes influências da temperatura

$$\eta = Ce^{\left(\frac{E_A}{RT}\right)} \dots \quad (4.2)$$

Onde C é uma constante,  $E_A$ , a energia de ativação de Arrhenius e T, a temperatura expressa em kelvin.

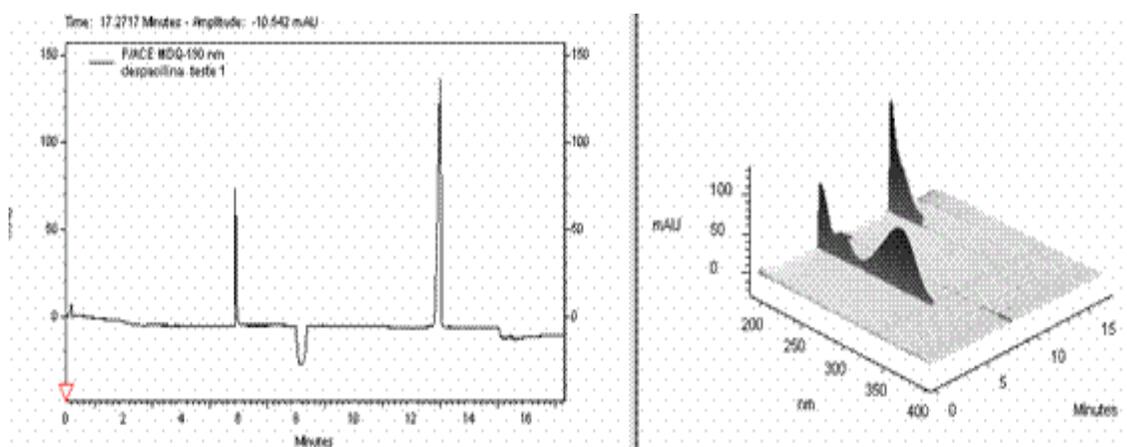
## 4.8 Eletroferogramas em diferentes condições

Foram realizadas separações dos compostos estudados em diferentes formulações. Na Benzetacil (Figura 4.8), pode-se observar o picos referentes à benzatina e à benzilpenicilina, antes e depois do EOF (vale observado devido à água)



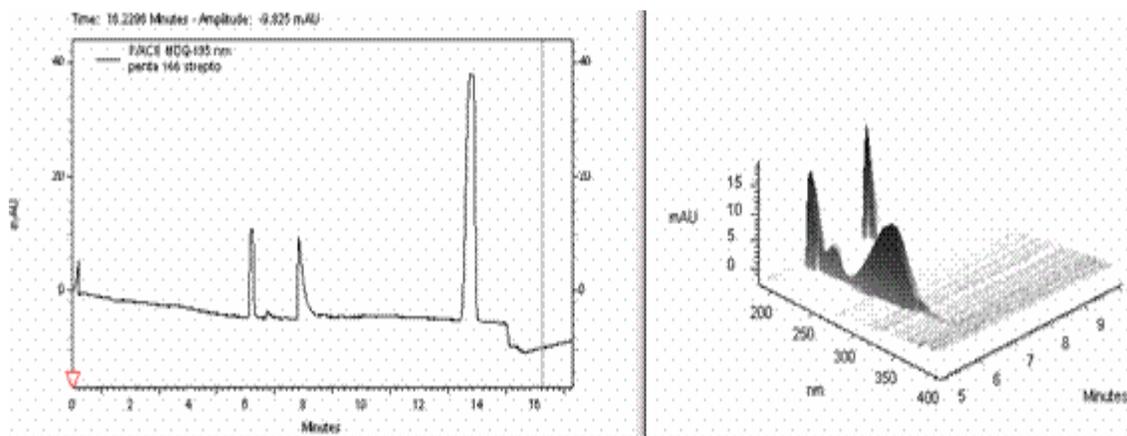
**Figura 31:** Eletroferograma do benzetacil em 190 nm e vista em 3D Fonte: (do autor)

Um comportamento similar foi observado para a despacilina, com a procaína (catiônica) antes do EOF.



**Figura 32:** Eletroferograma da despacilina Fonte: (do autor)

Para o pentabiótico, observou-se uma pequena concentração de benzatina, entretanto podem ser observados os picos da estreptomicina, benzatina e procaína e posteriormente, a benzilpenicilina.



**Figura 33** : Eletroferograma de uma amostra de Pentabiótico Fonte: (do autor)

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Mediante o uso da técnica de eletroforese capilar em zona livre, foi estudado o comportamento ácido-base de estreptomicina, diidroestreptomicina, benzilpenicilina e os contra-íons benzatina e procaína, usualmente presentes em associados em formulações veterinárias.

A variação da mobilidade eletroforética destas espécies químicas foi estudada na faixa de pH de 5,0 a 9,5 em diferentes sistemas tampão com força iônica controlada em 50 mmol/L com NaCl como eletrólito inerte.

Foi avaliado o uso de ajuste de modelos estatísticos não-lineares para a determinação de pKa a partir dessas medidas de mobilidade eletroforética e de condutividade.

O valor de pKa estimado para o grupo amina da benzatina foi de  $9,490 \pm 0,002$ . No caso da procaína, não foi possível estimar o pKa do grupo amino ligado ao anel aromático. O segundo pKa, contudo, referente ao grupo amina alifática ligada ao ácido p-aminobenzóico foi estimado em  $9,44 \pm 0,06$ . Estes valores estão em boa concordância com os reportados na literatura.

Entretanto, no caso da estreptomicina e diidroestreptomicina, espécies químicas onde se observa a existência de 3 grupos aceptores de próton (um grupo amínico e 2 grupos guanidínicos) não foi possível estimar os valores de pKa mediante o emprego do método proposto. Os valores de pKa usualmente observados para estes grupamentos encontram-se respectivamente entre 9 e 11 e acima de 11. Uma diferença menor que 4 unidades de pKa entre os grupamentos aceptores dificulta a aplicação da metodologia.

Foi confirmada a formação do aduto streptomicina-boro através do método das variações contínuas.

No caso da benzilpenicilina, verificou-se mobilidade eletroforética constante na faixa de pH estudada, evidenciando que o valor de pKa do grupo amino deve ser inferior a 4.

Como trabalho futuro, pode ser realizada a otimização do método para separação do probiótico e obtenção das figuras de mérito do método.

Além da otimização do método, pode ser feita uma avaliação de reações de derivatização para determinação de estreptomicina e dihidroestreptomicina visando o aumento da sensibilidade e uso de comprimentos de onda mais elevados e também uma avaliação dos produtos de degradação dos compostos envolvidos no probiótico e aplicação em fluidos biológicos, tais como sangue e urina.

## REFERÊNCIAS

ALTRIA, K. D., Validating CE methods for Pharmaceutical Analysis, **LC GC**, v. 25, Europe , 2001. p. 1-5.

ALTRIA, K. D., A Capillary idea, **American Chemical Society** ,v. 31, 2003. p. 45-49.

ALTRIA, K. D., Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analyses, **Electrophoresis**, v. 22, 2001. p. 3107-3130.

ALTRIA , K. D., Fundamentals of Electrophoresis. In:\_\_\_\_\_. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Fundamentals of Electrophoresis Theory**,1. ed., Totowa: Humana, 1996. p. 87-93.

ALTRIA , K. D., Application of Capillary Electrophoresis, **Electrophoresis**, v. 21, 2001. p. 269-281.

ALTRIA, K. D. ,Historical review of the theory and applications of capillary electrophoresis , **Electrophoresis**, v. 646, 1993.p. 1-23.

ALTRIA, K. D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 1 , p. 1-18, 1999.

ARAUJO, E. P, COSTA, M., BALABAN, R.G., Caracterização estrutural do fármaco sulfato de estreptomicina por espectroscopia na região do IV UV-visível e RMN 1D e 2D , **Sociedade Brasileira de Química**, 2003.

BECKERS, J.L., GEBAUER, P., BOCEK, P., System zones in capillary zone electrophoresis, **Electrophoresis**, v. 22, 2001.p.3648-3658.

BOWSER, M.T., CHEN, D.D.Y., The effect of complexation additives on analyte migration behavior in capillary electrochromatography, **Electrophoresis**, v. 19, 1998. p. 1452- 1460.

BWOCKEL,W.J,MARTINE,M.A,SAMIOS,D.,PEATINICKI,C.M.S, Um equipamento de eletroforese com detecção condutométrica construído em laboratório, **Química Nova**, v. 28 ,n° 6, 2005.

CAMILLERI,P. , Capillary electrophoresis, In:\_\_\_\_\_ **Capillary electrophoresis**, 2. ed., Boca Raton: CRC, 1993.p. 25-32.

CARTER, H.E.,CLARK,R.K., DICKMAN, S.R.,LOO,Y.H.,SKELL,P.S., STRONG,W.A., **Isolation and purification of streptomycin**, Urbana: University of Illinois, 1945.

COLOMBARA, R., TAVARES, M.F.M., MASSARO, S., Determinação Simultânea de ânions por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações. **Química Nova**, v. 20, n 5, 1997.p. 512-518.

CONNORS, K. A., Capillary electrophoresis, **Inc:\_\_\_\_\_ A textbook of pharmaceutical analysis**, 2 ed. , New York : Wiley, 1932.p. 58-60.

CORSTJENS, H. , et. al., Variation of the pH of the background electrolyte due to electrode reactions in capillary electrophoresis, **Electrophoresis**, v. 17, 1996. p. 137-143.

FLURER, C. L., **Electrophoresis**, Weinheim, Fed. Rep. of Germany: Wiley, 2001.p.809-816.

FRACASSI,J.,A,S, **Detecção condutométrica sem contato para eletroforese capilar de zona livre e cromatografia capilar electrocinética micelar**, São Paulo: USP, 2001.

FRACASSI,J.,A,S., Detecção eletroquímica em Eletroforese Capilar, **Química Nova**, v. 26, n. 1, 2003. p. 56-64.

FRACASSI,J.,A,S., FRASSATO, L., Construção de um detector amperométrico para eletroforese capilar, **Química Nova**, v.26, n 1, 2003.p. 26-56.

GAUDIN, V, LERMVD, AFSSA, **Community Reference Lab Antimicrobial Residues**, Fougères, France: ELSEVIER SCIENCE BV, 2004. p. 273-283.

GERVASIO, A.P.G., LAVORANTE, A.F.,MORAES, M.C.B, Eletroforese capilar acoplada à espectrofotometria com plasma: uma ferramenta eficiente para especificação, **Química nova**, vol 26, n. 1, 2003.p.65-74.

GORDON,M. J.,et al, Capillary Electrophoresis, **Science**, vol 242, ,1988. p. 224-228.

GROSSMAN, P.D.,COLBURN,J.C., Free zone electrophoresis, In:\_\_\_\_. **Capillary electrophoresis: theory and practice**, 2. ed., San Diego: Academic Press, 1992.p.233-241.

HERJETEN, Free zone electrophoresis. Theory, equipment and aplicações, **Methods of biochemical analysis**, v. 18 ,2000. p.55-79.

HERJETEN, High Resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis, **Journal of Chromatography**, v.218, 1981. p. 209-216.

JAGER,A,V.;TAVARES, M.F.M., Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações, **Química Nova**, v. 24,n. 3, 2001.p.363-373,

JORGENSON, J.W, High Resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis, **Journal of Chromatography**, v. 218, 1981. p. 209-216.

JORGENSON, J.W, Free zone electrophoresis in glass capillaries, **Clinical Chemistry**, 1981, p.1551-1553

KIM, BH. , **Biomedical Chromatography**, South Korea : John Wiley Sons, 2003. p. 396-403.

KOROLKOVAS, A. **Farmacopéia Brasileira**, 4. ed. Atheneu São Paulo ,1988. p. 73.  
KOTRLY, S., SUCHA, L., Electroosmosis, Inc:\_\_\_\_. **Handbook of Chemical Equilibria in Analytical Chemistry**, 3 ed. , Chinchester: Ellis Horwood, 1985. cap. 3.

KUBAN,P.,KARLBERG,B. Simultaneous Determination of Small Cations **Anal. Chem**, v. 70, 1998.p.360-365.

KUHR, W., G., Capillary Electrophoresis, **Anal. Chem.** , v. 62, 1990. p. 403- 414.

KUHN, S.H. PAULUS, A., GASEMANN, E., WIDMER, H.M., Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis, **Anal. Chem.** v. 63, 1991.

LANDERS, J.P., **Handbook of capillary electrophoresis**, Boca Raton: CRC Press, 1997.

LI, Y.M., DEBREMAECKER, VAN , A, ROETS, E., HOODMARTENS, J., Simultaneous analysis of streptomycin e dhydrostreptomycin and their related substances by capillary zone electrophoresis, and Anions by Capillary Electroforesis, **Liq. Chrom.& Rel. Technol.** ,v.23, 2000. p. 2979-2990.

LIE, T.F., COSTAPINTO, C.S., **Análise quantitativa de fármacos quirais utilizando eletroforese capilar**, Universidade de Campinas.

LUNTE, S.M.,RADZIK,D.M., **Pharmaceutical and biomedical application of capillary electrophoresis**, Oxford: Perganon.1996.

MARTINDALE, W., H., **Extra pharmacopoeia**, 31. ed., London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p 132.

MIRANDA,C.,E.,S., et al.,Sistemas Interfaceados de Análise por Injeção em Fluxo e Eletroforese Capilar: Desafios, Aplicações e Perspectivas, **Química Nova**, v.25, n3, 2002.p. 412-419,

NERENBERG, S.T., **Electrophoresis: Manual prático de laboratório**, 2. ed. Barcelona: Jims, 1968.

P.E, C.P. , CURTIS, M.J., SUTTER, M.C, WALKER, M.J.A, HOFFMAN, B.B. **Farmacologia integrada**, Espanha: Manole , 1999.

REINHARD, K. **Electrophoresis , Inc:\_\_\_\_\_ . Capillary electrophoresis: principles and practice**, 3. ed. ,Berlin: Springer,1993.p.32-33.

RIEKKOLA, M.,J., JONSSON, J., A., SMITH, R.,M. **Pure Appl. Chem.**, v. 76, n° 2, 2004. p. 443-451.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C.H., JARDIM, I.C.S.F., MELO, L.F.C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n 5, 2004.

ROCHA, T.L. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**, ISSN 9192-0099, Brasília, DF, 2005.

SALVATORI, F. , Use of cyclodextrins in capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography**, 545, 1991. p. 437-444.

SANTORO, M.,I.,R.,M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n.1 , 2000.p. 97-107,

SANTOS, J.C.F; SILVA, A.A S.T.; SANTOS, G.S; GERVASIO, A P.G, Eletroforese Capilar: Uma nova técnica a ser introduzida em nível de graduação, **Sociedade Brasileira de química**, Universidade Federal de Sergipe.

SOLTES, L., [Biomedical Chromatography](#) , Slovakia : John Wiley & Sons, 1999. p. 3-10.

STEAD, D.A., Current methodologies for the analysis of aminoglycosides, **Journal of Chromatography B**, 747, 2000.p.69-93.

SUDOR, J., POSPICHAL, J., DEML, M., BOCEK, P. Step change of co-ion, a new option in capillary zone electrophoresis, **Journal of Chromatography**, 545, 1991.p. 331-336.

SZEPESI, G., **HPLC in pharmaceutical analysis**, 2 ed., Boca Raton: CRC Press 1990. p.193-194

TAVARES, M.,F.,M., Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar, **Química Nova**, 20,1997.p. 493-511

TAVARES, M.,F.,M.; SANTOS, M.R.; RUBIN, J.C., Implementação de um sistema de eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser, **Química Nova**, v.23, p. 2000.585-589.

USP DI .**United States Pharmacopeial Convention**, 14 ed., Rockville, MD 3 v.,1994.  
VAN, Bruijnsvoort, **Inspectorate Hlth Protect & Vet Publ Hlth** . Zutphen, Netherlands:  
Elsevier B.V, 2004. p. 137-142.

VERNON E. C., M JAMES D. , REID J.S. , RYBICKI E.P., **Molecular Biology  
Techniques Manual** University of Cape Town , 1996.

WEINHBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**, Boston: Academic Press,  
1993.

YAN XU, Tutorial: capillary electrophoresis, **The chemical educator**, Springer – verlag  
, New York, vol 1 , n.1 , 1996.

ZIMMERMAN, Wolfgang, LARSEN, Kin L., Analysis and characterization of  
cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis, **Journal  
of Chromatography A** , v. 3, 1999.p. 3-14.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)