

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ALICEANA ALMEIDA DO PRADO

**DETERMINAÇÃO DE AMINOFILINA EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR COM
DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO (CE-C⁴D)**

Uberlândia
01/2023

ALICEANA ALMEIDA DO PRADO

**DETERMINAÇÃO DE AMINOFILINA EM FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR COM
DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO (CE-C⁴D)**

Trabalho apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial à conclusão do curso de
Química Licenciatura.

Orientador: Eduardo Mathias Richter

Uberlândia
01/2023

Sapere aude
Immanuel Kant

RESUMO

Neste trabalho foi descrito um estudo para determinação de aminofilina (AMI), um sal formado pelo complexo entre a teofilina (TEO) e a etilenodiamina (ETI), em amostras farmacêuticas utilizando a técnica de eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D). O tampão de corrida (BGE) composto por 15 mmol L⁻¹ de trietanolamina (TEA) + 20 mmol L⁻¹ de ácido 3,4 dimetoxicinâmico (DMX) com pH ajustado em 9,0 (com a adição de KOH) foi o que apresentou o melhor desempenho em relação a tempo de análise, resolução e formato/intensidade de pico na separação de ETI e TEO. Os tempos de migração obtidos para ETI e TEO foram de 25 s e 62 s, respectivamente. Nestas condições, cerca de 58 injeções h⁻¹ são possíveis. Os limites de detecção (LD) foram de 11 µmol L⁻¹ e 12 µmol L⁻¹ para ETI e TEO, respectivamente. Nos estudos de adição e recuperação, valores de 96 ± 3 % para ETI e 99 ± 2 % para TEO foram obtidos. O método proposto pode ser usado no controle de qualidade de matérias primas e de formulações farmacêuticas que tenham o sal aminofilina (ETI + TEO) na sua composição.

Palavras-chave: Análises rápidas, etilenodiamina, teofilina, aminofilina, formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

In this work, a study for the determination of aminophylline (AMI), a salt formed for a complex between theophylline (TEO) and ethylenediamine (ETI), in pharmaceutical samples using Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection (CE-C⁴D) is described. The background electrolyte (BGE) was composed by 15 mmol L⁻¹ of triethanolamine (TEA) + 20 mmol L⁻¹ of 3,4-dimethoxycinnamic acid (DMX) with pH adjusted to 9.0 with KOH showed the best performance in terms of analysis time, resolution, peak shape, and peak intensity. The migration times obtained for ETI and TEO were 25 s and 62 s, respectively. Under these conditions, about 58 injections h⁻¹ are possible. The limits of detection (LD) were 11 μmol L⁻¹ and 12 μmol L⁻¹ for ETI and TEO, respectively. In addition, the proposed method presented satisfactory results in the recovery tests (96 ± 3 % for ETI and 99 ± 6 % for TEO). Furthermore, CE-C⁴D methods can be used in the quality control of raw materials and pharmaceutical formulations that have aminophylline salt (ETI + TEO) in their composition.

Keywords: Fast analysis, ethylenediamine, theophylline, aminophylline, pharmaceutical samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da interface da solução com a parede interna do capilar de sílica fundida..... 16
- Figura 2.** Sistema de detecção C⁴D com dois eletrodos (E1 e E2) e a representação do eletroferograma com o pico positivo e negativo.20
- Figura 3.** Fórmula estrutural da molécula de aminofilina (AMI).....21
- Figura 4.** Equipamento de Eletroforese Capilar usado nos experimentos (CE-C⁴D).....25
- Figura 5.** Curva da relação de carga versus pH da molécula da etilenodiamina (ETI).26
- Figura 6.** Curva de relação de carga versus pH da molécula de teofilina (TEO).27
- Figura 7.** Eletroferogramas obtidos com uma solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI usando BGEs de diferentes composições: **(A)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + NaOH (pH=9,0); **(B)** 20 mmol L^{-1} TRIS + 20 mmol L^{-1} TAPS (pH=8,2); **(C)** 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH (pH= 9,0); **(D)** 20 mmol L^{-1} ácido fosfórico + NaOH (pH=7,9). *pico não identificado. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; potencial aplicado: + 25 kV (lado da injeção); tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).....28
- Figura 8.** Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com os seguintes BGEs: **(a)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(b)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + NaOH (pH=9,0). *pico de sistema. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa). 29
- Figura 9.** Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMI com os seguintes BGEs: **(a)** 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH (pH= 9,0); e **(b)** 20 mmol L^{-1} CHES + KOH (pH= 9,0). pico de sistema. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).....29
- Figura 10.** Eletroferogramas obtidos para uma solução **(a)** padrão (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e **(b)** solução amostra de AMI. BGE: 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0). *pico não identificado. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).....30

Figura 11. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI usando BGEs com diferentes concentrações de TEA: **(a)** 10 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(b)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(c)** 15 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); e **(d)** 20 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0). *pico de sistema. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; Potencial aplicado: 25kV; Tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa)..... 31

Figura 12. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMI com diferentes concentrações de DMX no BGE: **(a)** 15 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(b)** 15 mmol L^{-1} TEA + 22 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); e **(c)** 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0). *pico não identificado. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa). 32

Figura 13. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI em função da variação do pH do BGE: (a) pH= 9,7; (b) pH= 9,4; e (c) pH= 9,0. *pico não identificado. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até pH indicado; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa). . 33

Figura 14. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMI em função da variação no tempo de injeção a uma pressão constante de 25 kPa: (a) 0,5 s; (b) 1,0 s; (c) 1,5 s; (d) 2,0 s; (e) 3,0 s; e (f) 4,0 s. *pico não identificado. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até pH=9,0; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: +25kV. 34

Figura 15. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMI em função do potencial de separação empregado: (a) 25kV; (b) 20kV; e (c) 15kV. *pico não identificado. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até pH=9,0; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; tempo de injeção: 2,0 s (25 kPa)..... 35

Figura 16. Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas de solução padrão contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ AMI. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até pH=9,0. *pico de sistema; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 2,0 s (25 kPa)..... 36

Figura 17. Curvas de calibração obtidas a partir eletroferogramas obtidos com a injeção de soluções padrões com concentrações crescentes de ETI (0,05-3,0 mmol L⁻¹) e TEO (0,1-6,0 mmol L⁻¹). Demais condições vide Figura 13.36

Figura 18. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões contendo concentrações crescentes de ETI (0,2-0,6 mmol L⁻¹) e TEO (0,4-1,2 mmol L⁻¹) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições vide Figura 13.37

LISTA DE ABREVIATURAS

AMI – Aminofilina

BGE – Eletrólito de corrida (do inglês “*Background Electrolyte*”)

C⁴D – Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (do inglês, “*Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection*”)

CE – Eletroforese Capilar (do inglês “*Capillary Electrophoresis*”)

CHES – Ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico

CZE – Eletroforese Capilar de Zona (do inglês “*Capillary Zone Electrophoresis*”)

DMX – Ácido 3,4 - dimetoxicinâmico

E – Potencial

EOF – Fluxo eletrosmótico (do inglês “*Electroosmotic Flow*”)

ETI – Etilenodiamina

GC – Cromatografia gasosa (do inglês “*Gas chromatography*”)

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

IHP – Plano Interno de Helmholtz (do inglês, “*Inner Helmholtz Plane*”)

KOH – Hidróxido de Potássio

LC – Cromatografia Líquida (do inglês “*Liquid chromatography*”)

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

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

NaOH – Hidróxido de sódio

OHP – Plano Externo de Helmholtz (do inglês, “*Outer Helmholtz Plane*”)

pH – Potencial Hidrogeniônico

TEA – Trietanolamina

TEO – Teofilina

TRIS – Propano 2-amino-2,2-hidroximetil-1,3 diol

UV-Vis – Ultravioleta – Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições otimizadas para o método CE-C ⁴ D desenvolvido.....	35
Tabela 2. Características analíticas do método proposto.....	38
Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de ETI e TEO por CE-C ⁴ D.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Breve histórico	13
1.2	Fundamentos teóricos	14
1.2.1	Mobilidade efetiva.....	14
1.2.2	Fluxo eletrosmótico.....	15
1.3	Sistemas de detecção em CE	17
1.3.1	Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C ⁴ D).....	19
1.4	Aminofilina.....	21
2	OBJETIVOS	23
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	24
3.1	Reagente e soluções	24
3.2	Instrumentação	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5	CONCLUSÃO	39
6	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 Breve histórico

Ao longo dos anos, as técnicas de separação tiveram vários avanços, sendo que na década de 50 houve o desenvolvimento da cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês “*Gas Chromatography*”). Posteriormente, na década de 70, o aperfeiçoamento da cromatografia líquida (LC, do inglês “*Liquid Chromatography*”) começou a tornar esta técnica conhecida na química analítica. Mais tarde, na década de 80, a técnica de separação conhecida como eletroforese capilar (CE, do inglês “*Capillary Electrophoresis*”) foi desenvolvida (TAVARES, 1995, 1997).

A CE é uma técnica empregada para separação de determinadas espécies dentro de uma solução eletrolítica, com aplicação de um campo elétrico. O início do seu desenvolvimento com a necessidade do estudo de proteínas em soro. O químico e bioquímico sueco, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, desenvolveu uma técnica de separação baseada na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em um eletrólito, quando aplicado um campo elétrico (TISELIUS, 1926). Em 1948, pela grande contribuição na área de CE (separação de proteínas em um campo elétrico), Tiselius ganhou o prêmio Nobel de Química.

O método de separação apresentado por Tiselius consistia em a amostra era aplicada em um tubo, em formato de U, recheado com a solução tampão, e então um potencial elétrico era aplicado nas extremidades, assim, os analitos migravam por atração coulômbica de acordo com suas cargas. Além disso, entre as dificuldades enfrentadas por Tiselius, há a instabilidade do equipamento, separação incompleta dos componentes da amostra (efeitos de difusão), e o aquecimento gerado pelo elevado campo elétrico necessário (efeito Joule) (HJERTÉN, 1967).

Hjerten, em 1967, propôs a utilização de campos elétricos mais elevados e tubos capilares de quartzo com diâmetro interno de 0,3 mm e comprimento total de 36 cm. Além disso, um sistema giratório foi utilizado para diminuição dos efeitos de convecção e, assim, zonas mais distintas de separação foram obtidas. No entanto, as dificuldades com eficiência de separação foram mantidas (HJERTÉN, 1983). Já na década de 80, a eletroforese teve um grande desenvolvimento, pois Jorgenson e Lukacs propuseram a implementação, pela primeira vez, de capilares de vidro com diâmetros internos muito menores (d.i. de 75 μm) e, com isso, o efeito Joule que prejudicava o desempenho da técnica diminuiu a ponto de se tornar negligenciável (HJERTÉN, 1967, 1983).

A utilização de capilares com diâmetro interno da ordem de micrometros ($< 100 \mu\text{m}$) resultou no aumento da relação entre área superficial interna do capilar e o volume da solução, favorecendo a dissipação do calor e aplicação de campos elétricos mais elevados. Assim, os tempos de análises foram diminuídos radicalmente e uma maior eficiência de separação também foi obtida.

A CE tem como vantagens uma menor demanda de reagentes (cerca de nanolitros de amostra são injetados no capilar em cada análise), possibilidade de automação da análise, baixo custo do equipamento, tempos de análises reduzidos (quando comparado com HPLC - técnica de separação mais utilizada) e possibilidade de injeção de amostras sem pré-tratamento (COSTA, 2018; JAGER; TAVARES, 2001; MARRA, 2018; OLIVEIRA, 2019; RIBEIRO, 2022).

1.2 Fundamentos teóricos

As discussões nesse tópico são aplicáveis à eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês “*Capillary Zone Electrophoresis*”) quando capilares de sílica fundida são utilizados. Ao utilizar outro tipo de eletroforese, as equações podem sofrer pequenas modificações, contudo, o fundamento é similar. A CZE é a mais explorada das técnicas eletroforéticas, mostrando-se útil para a separação de um vasto conjunto de analitos, entre os quais podemos destacar os carboidratos, íons orgânicos, íons inorgânicos, peptídeos e fármacos. O mecanismo de separação da CZE fundamenta-se na mobilidade das espécies de uma solução quando esta solução é introduzida em um meio tamponado como uma banda de pequena espessura. Quando o potencial de separação é aplicado, cada zona migra independentemente, com velocidade constante, mas diferenciada, característica de sua própria mobilidade (OLIVEIRA, 2019).

1.2.1 Mobilidade efetiva

A mobilidade eletroforética de eletrólitos fortes (íons provenientes de ácidos ou bases fortes) é relativamente simples de entender. No entanto, em CZE também é necessário compreender o conceito de mobilidade efetiva para explicar a migração de eletrólitos fracos. Este é o caso de bases ou ácidos inorgânicos/orgânicos que podem estar parcialmente ionizados, ou seja, parte das espécies apresentam carga positiva ou negativa e a outra parte é neutra. A mobilidade efetiva (μ_{ef}) pode ser compreendida pela definição de Tiselius, quaisquer substâncias (j), em solução de formas diferentes (j), estão relacionadas entre si por uma

constante equilíbrio ácido base e, por esse motivo, migram em uma única banda. A migração das espécies em um campo elétrico ocorre em função de sua mobilidade efetiva, onde α é o grau de ionização do analito em estudo (Equação 1) (TAVARES, 1995).

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

Além disso, ao aplicar um potencial (E), há a velocidade eletroforética efetiva (v_{ef}), definido pela Equação 2.

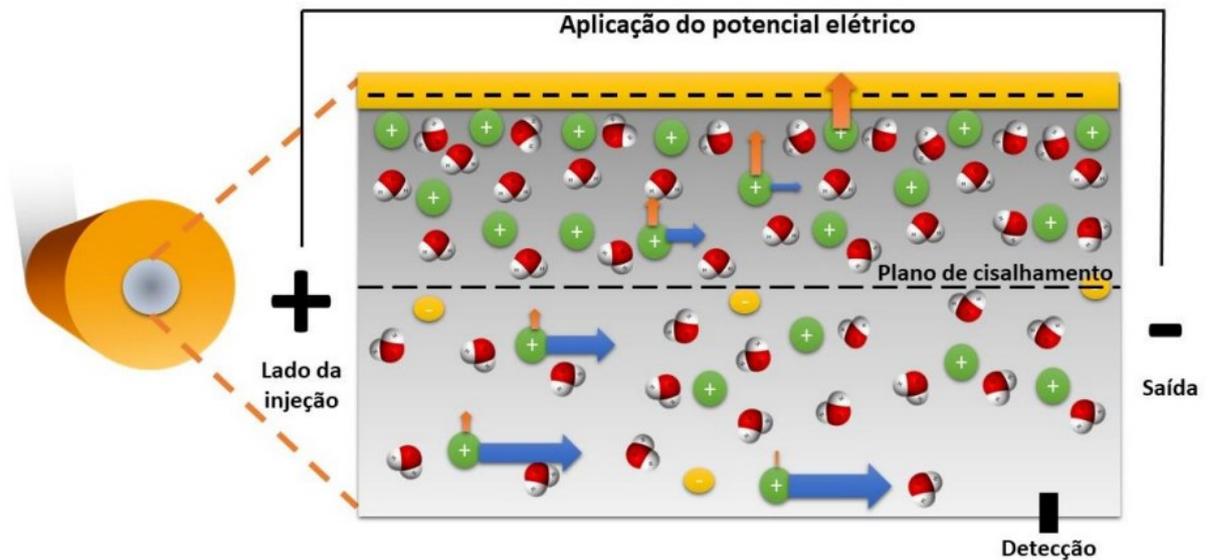
$$v_{ef} = \mu_{ef} E \quad \text{Equação (2)}$$

A distribuição de carga dos analitos depende das suas respectivas constantes de dissociação (pKa). A equação 2 demonstra a dependência da velocidade em relação a mobilidade efetiva que depende diretamente do grau de ionização do analito, ou seja, o pH do meio tem uma influência significativa na velocidade de migração das espécies em interesse, por esse motivo a escolha do eletrólito de corrida (BGE) é de extrema importância (RIBEIRO, 2017). Adicionalmente, é importante mencionar que o controle de pH (tamponamento), neste caso, é mandatório.

1.2.2 Fluxo eletrosmótico

O material mais utilizado para fabricação de capilares em separações eletroforéticas é a sílica fundida. No capilar de sílica fundida há a presença dos grupos silanóis ionizáveis (SiOH) na sua superfície (pKa \cong 6), os quais podem gerar cargas negativas na parede interior do capilar (SiO⁻). Em valores de pH mais elevados, ou seja, mais alcalinos, os grupos silanóis estarão mais desprotonados e, conseqüentemente, a parede interna estará mais negativamente carregada. Por outro lado, em valores de pH menores, os grupos silanóis estarão mais protonados e a parede interna estará com carga negativa menor ou até mesmo neutra (pH < 4) (RIBEIRO, 2022). Uma ilustração da superfície do capilar pode ser observada na Figura 1.

Figura 1. Representação da interface da solução com a parede interna do capilar de sílica fundida.



Fonte: RIBERIO, 2022

Quando a parede interna do capilar estiver carregada negativamente, as espécies com cargas positivas do BGE serão atraídas pela superfície do capilar devido as forças eletrostáticas ou por forças de coesão, formando uma primeira dupla camada elétrica, uma camada fixa, conhecida como plano interno de Helmholtz (IHP). Posteriormente, existe a formação de uma segunda camada, denominada plano externo de Helmholtz (OHP), pois ainda há íons positivos na solução, porém menos atraídos pela parede negativa do capilar. Ao se distanciar da parede do capilar, a concentração dos contra-íons diminui aos poucos até alcançar o equilíbrio com a concentração dos íons no seio da solução, sendo que essa região é chamada de camada difusa da dupla camada elétrica (JAGER & TAVARES, 2001).

A região onde há a interface entre essas duas camadas formadas (IHP e OHP), ocorre o início da movimentação de íons e é chamado de "Plano de Cisalhamento". Ao aplicar o campo elétrico da separação da CE nesse sistema, uma camada móvel de cátions (solvatados), é atraída ao polo negativo, o cátodo. Essa movimentação acaba induzindo uma movimentação da solução como um todo no interior do capilar e é conhecida como fluxo eletrosmótico (EOF). (MARRA, 2018). Os ânions continuarão migrando em direção ao ânodo, no entanto, quando a velocidade do EOF for maior que a velocidade dos ânions, estes também poderão ser transportados ao detector posicionado do lado do cátodo do sistema de CE.

A existência do EOF é de fundamental importância para a CE, pois durante a migração, os íons transportam moléculas de água, gerando o fluxo da solução como um todo em direção

ao cátodo (polo negativo) quando do uso de capilar de sílica fundida. Com a velocidade eletrosmótica de grande magnitude (resultante do EOF), o fluxo é capaz de conduzir os solutos, em uma única direção independentemente de suas cargas (cátions ou ânions). Assim, a determinação simultânea de espécies catiônicas, aniônicas e neutras em uma amostra (movimentação em uma mesma direção) é possível (WEEKLEY & FOLEY, 2007).

Os fármacos existentes no mercado, em sua grande maioria, são formados por compostos iônicos (em forma de sais), logo, essa característica é de extrema importância para análises desse tipo de amostra (KOENKA *et al.*, 2016). Os medicamentos devem ser monitorados em várias etapas do processo farmacêutico, desde o seu desenvolvimento até o controle de qualidade final. Portanto, a determinação de simultânea de cátions e ânions é importante, a possível presença de impurezas pode ser proveniente de catalise de fármaco ou do processo de fabricação, podendo afetar o usuário do medicamento.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é muito utilizada no controle de qualidade de fármacos, entre os tipos de cromatografia líquida utilizadas estão a cromatografia de íons (CALISEVICI *et al.*, 2011), colunas de troca catiônica e aniônica (MENG *et al.*, 2008), ou colunas com caráter anfótero e fases estacionárias (CRAFTS *et al.*, 2009). Contudo, essas técnicas requer uma instrumentação mais complexa quando comparada com a CE. A aplicação de métodos mais simples para o controle de qualidade é de grande interesse, a utilização da CE pode ser eficaz nesse sentido quando comparado com a técnica utilizada comumente, a fim de minimizar o tempo de trabalho e gasto com soluções.

1.3 Sistemas de detecção em CE

O tipo de detector utilizado está intrinsicamente ligado ao bom desempenho de uma técnica de separação. Nas últimas décadas vários modelos de detectores vêm sendo estudados por pesquisadores, com a finalidade de obtenção de melhores resultados na análise de diferentes amostras. Os detectores mais utilizados em CE são o espectrofotométrico (UV/Vis), seguido pela fluorescência, espectrometria de massas e condutométrico (eletroquímico). Os detectores, em função de suas características, podem ser classificados em seletivos ou universais. Os detectores seletivos monitoram uma característica do soluto e os universais respondem a qualquer alteração no monitoramento do sinal (geralmente uma alteração de uma característica do BGE) quando a espécie passa pela janela de detecção (SILVA, 2003).

A detecção pela absorção UV-Vis mede o quanto uma substância química absorve de luz, sendo considerada seletiva, pois um comprimento de onda é selecionado a partir do grau

de absorvidade do analito de interesse. Além disso, a detecção indireta também pode ser utilizada, adicionando-se um cromóforo na composição do BGE, assim, uma diminuição na absorvância é medida, quando os analitos (sem absorvidade no respectivo comprimento de onda) passam pela janela de detecção. Para a utilização desse detector no capilar é necessário a remoção do revestimento de poliimida ou do uso de uma célula de quartzo (ZEMANN, 2003). Esse modelo de detecção possui limitações quanto a determinação de espécies não sensíveis ao UV-Vis. Por outro lado, a detecção indireta pode apresentar limitações em relação a precipitação (função do pH), importante para manutenção da estabilidade do cromóforo adicionado ao BGE (NEHMÉ *et al.*, 2010).

Os detectores de fluorescência medem a fluorescência contra uma radiação de fundo (background) bastante baixa, assim, pequenas quantidades de luz, emitidas pelos analitos podem ser medidas, possibilitando maior detectabilidade. Para espécies não fluorescentes, o uso da detecção fluorimétrica somente é possível após etapas de derivatização dos componentes das amostras antes das análises, o que pode agregar erros provenientes da etapa de preparo das amostras (TAMIZI; JOUYBAN, 2015).

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada com o intuito da elucidação de compostos desconhecidos e quantificação de compostos conhecidos. O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização onde os analitos presentes nas amostras são convertidas em íons, transferidos para a fase gasosa, e inseridos em um analisador de massa (relação carga/massa) destes íons e um detector. Para essa técnica o eletrólito de corrida deve ser volátil e puro, o que gera limitações na faixa de pH de trabalho (LANÇAS, 2013).

Dentre os detectores eletroquímicos existem os amperométricos, os potenciométricos e os condutométricos. A amperometria é um método de detecção sensível e possui boa seletividade, mas a adaptação dentro ou próximo ao capilar não é tão simples, pois o eletrodo de trabalho no sistema de CE não pode interferir no campo elétrico (princípio de separação da CE). Já os métodos potenciométricos detectam a diferença de potencial com a relação à solução que preenche o capilar (BGE) e o sensor, sendo que essa diferença é proporcional à concentração do íon detectado (SWINNEY; BORNHOP, 2000).

Os detectores condutométricos medem a condutividade ou resistividade dos analitos entre dois eletrodos, podendo estar ou não em contato com a solução eletrolítica. Quando os analitos passam entre esses eletrodos a mudança na condutividade é medida, essa variação na condutividade possui relação direta com a concentração dos analitos iônicos presente na solução (SWINNEY; BORNHOP, 2000).

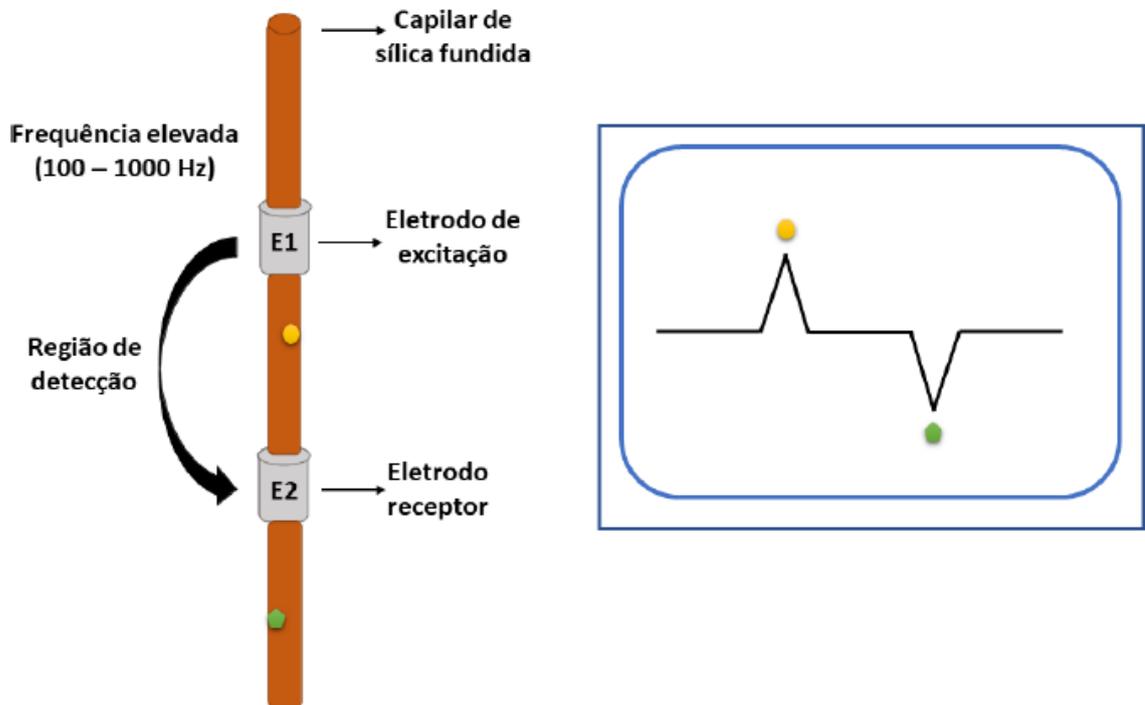
1.3.1 Detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D)

A detecção condutométrica sem contato começou a ser utilizado em 1928 por Zahn (ZAHN, 1928). Contudo, a detecção condutométrica aplicada a CE começou a ser estudada apenas em 1972 (VAN DER *et al.*, 1972), sendo empregada inicialmente na isotacoforese. Já em 1985 foi demonstrado a utilidade desse tipo de detector na CZE (DEML *et al.*, 1985). Em 1998, Zemann e colaboradores (ZEMANN *et al.*, 1998) e Fracassi da Silva e do Lago (FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 1998), em trabalhos independentes, introduziram a detecção condutométrica sem contato (C⁴D). Assim, a partir de 1998 muitos trabalhos foram publicados sobre a construção e aplicação de detectores condutométricos em CE.

A C⁴D não necessita que o capilar seja perfurado, o que era comum nos detectores condutométricos convencionais, perfurados com laser de CO₂, e, conseqüentemente, tinham contato com a solução no interior do capilar (FRACASSI DA SILVA; DO LAGO, 2000). Com o advento da C⁴D foi possível eliminar algumas limitações do detector de condutividade com contato como contaminação do BGE e/ou dos padrões utilizados e a diminuição considerável da interferência do campo elétrico, obtendo, desta forma, uma melhor estabilidade e resposta analítica (BRITO-NETO *et al.*, 2005).

Na detecção C⁴D, um sinal senoidal de elevada frequência (100 a 1000 kHz) é aplicado aos eletrodos integrados (geralmente metálicos) posicionados ao redor do capilar. Os eletrodos medem a condutividade da solução que flui pelo capilar. Um eletrodo atua como transmissor, emitindo um sinal senoidal de alta frequência de corrente alternada e o outro eletrodo atua como receptor (ZEMANN *et al.*, 1998). À medida que ocorre a migração dos íons no interior do capilar, há a variação da condutividade, correspondente a variação na corrente elétrica entre os eletrodos de detecção. Assim, o monitoramento do sinal resulta em picos relacionados aos analitos separados, dependentes da concentração das espécies (Figura 2).

Figura 2. Sistema de detecção C^4D com dois eletrodos (E1 e E2) e a representação do eletroferograma com o pico positivo e negativo.



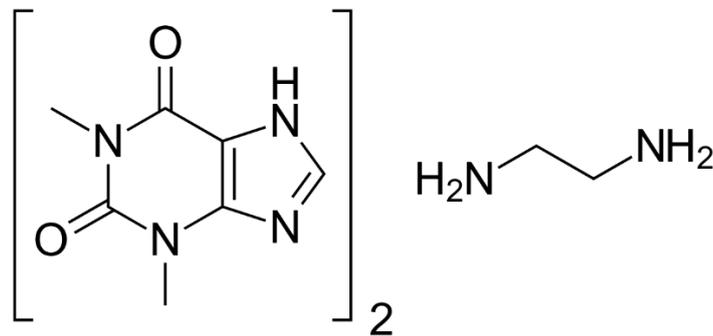
Fonte: (Ribeiro, 2022)

A resposta de detecção baseia-se na diferença de condutividade entre o co-íon presente no BGE e o íon a ser analisado. Quando a mobilidade do analito for maior ou menor que a do co-íon do BGE ocorre um aumento ou diminuição da condutividade na região do capilar e o detector é sensibilizado, resultando no pico positivo ou negativo no eletroferograma, respectivamente. Em 2009, Francisco e do Lago (FRANCISCO; DO LAGO, 2009) desenvolveram um modelo mais compacto do C^4D , sendo que este modelo foi utilizado nos procedimentos descritos nesse trabalho. Nesta versão, a frequência e a amplitude foram otimizadas e fixadas para um melhor desempenho, por simplicidade e robustez.

1.4 Aminofilina

A aminofilina (AMI) é um sal formado pelo complexo entre a etilenodiamina (ETI) e a teofilina (TEO), como apresentado na Figura 3. Segundo levantamento realizado, a combinação desses compostos deve conter no mínimo 84,0% e no máximo 87,4% de ETI e entre 13,5% e 15,0% de TEO (m/m) (FARMACOPÉIA, 2010).

Figura 3. Fórmula estrutural da molécula de aminofilina (AMI).



A TEO é uma N-metil derivada das xantinas, compõe o grupo dos alcaloides que são encontrados em plantas e podem ser utilizadas em bebidas alimentícias ou como estimulantes do sistema nervoso central (ARAGÃO *et al.*, 2009). A TEO é um potente broncodilatador, pois relaxa o músculo liso das vias aéreas brônquicas e dos vasos sanguíneos pulmonares, reduzindo a resposta das vias aéreas à histamina, metacolina, adenosina, entre outros. É um antagonista não seletivo dos receptores de adenosina, induzindo a ação adrenérgica broncodilatadora e há também uma ação anti-inflamatória, reduzindo o número de eosinófilos e nucléolos, além disso, é um medicamento de baixo custo (ARALIHOND *et al.*, 2020; DOUKKY *et al.*, 2012).

As xantinas possuem baixa solubilidade, tornando-se necessário, para uso farmacológico, a formação de complexos com substâncias mais solúveis. Assim, como a TEO não é solúvel em água, a opção foi a formação de uma combinação com a ETI, resultando na AMI (CALDWELL *et al.*, 1986; ROLOOF, 2006). Este medicamento apresenta-se com um pó em grânulos brancos ou levemente amarelados e possuem um leve odor amoniacal e sabor amargo (FARMACOPÉIA, 2010). A AMI é utilizada principalmente para terapia da doença pulmonar obstrutiva crônica e asma, há também recomendações para o tratamento de enfisema e no tratamento de apneia neonatal (KLIMOVIC *et al.*, 2022; YE *et al.*, 2019; ZATLOUKAL *et al.*, 2020).

Com o avanço da medicina e o desenvolvimento de novos fármacos há o aumento da expectativa de vida (IBGE, 2017). Esse progresso, juntamente com o aumento populacional e a modernização levou a uma geração mais dependente de produtos químicos. Desta forma, o controle de qualidade destes produtos é essencial, não apenas com a finalidade de checar a procedência da matéria-prima utilizada, mas, também, análises referentes ao teor de princípio ativo presente nas formulações comerciais. Assim tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, confiáveis, e ambientalmente amigáveis (menor gasto de energia e geração mínima de resíduos) a fim de suprir a necessidade de várias análises diárias em um curto período de tempo (COSTA, 2018).

Na literatura existem trabalhos que mostram a possibilidade para determinação da aminofilina por HPLC com detecção UV-Vis, espectrofotometria, quimiluminescência, titulação, e ressonância magnética nuclear (CHEN *et al.*, 2021; DE BLAEY *et al.*, 1984; DE FABRIZIO, 1977; GRIFFENHAGEN, BRADY, 1951; LEI, 2014; LI *et al.*, 2009; LI, ZHANG, 2008; TURCZAN *et al.*, 1972; M. WANG *et al.*, 2020; R. WANG *et al.*, 2013; Z. WANG *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 2003; ZHANG, STEWART, 1994). Além disso, a determinação da ETI presente na AMI também foi demonstrada empregando HPLC e eletroforese capilar com detecção amperométrica (GE *et al.*, 2013; ISHIGURO *et al.*, 1980). Para a determinação simultânea de TEO e ETI foi encontrado apenas um trabalho na literatura. Neste caso, a técnica usada foi HPLC com detecção fotométrica e a duração da análise era em torno de 20 minutos (LAU-CAM; ROOS, 1991).

2 OBJETIVOS

Desenvolver um método simples, rápido, barato e ambientalmente amigável para determinação simultânea de etilenodiamina e teofilina (sal de aminofilina) em amostras farmacêuticas utilizando a técnica a eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagente e soluções

As soluções foram preparadas usando água deionizada de alta pureza (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Direct-Q3, Bedford, MA, USA). Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. Ácido 3,4 dimetoxicinâmico (DMX), propano 2-amino-2-hidroxi-1,3-diol (TRIS), ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfônico (CHES), trietanolamina (TEA), hidróxido de potássio (KOH) e AMI foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Hidróxido de sódio e ácido fosfórico foram adquiridos das empresas Dinamica (Diadema, Brasil) e Merck (Darmstadt, Alemanha), respectivamente.

As amostras farmacêuticas utilizadas nos experimentos foram obtidas em farmácias locais. No procedimento de preparo das amostras, oito comprimidos foram pesados e macerados até um pó fino e homogêneo. Posteriormente, uma massa adequada de pó foi pesada e diluída em água deionizada, em um balão volumétrico. As soluções estoques de padrões e amostras foram preparadas diariamente antes das análises. Além disso, todas as amostras foram submetidas a agitação e sonicação por 5 minutos em um banho ultrassom e depois filtradas usando filtro de membrana (tamanho de poro de 0,45 μm) e analisadas no sistema CE-C⁴D.

3.2 Instrumentação

Todos os eletroferogramas foram obtidos com um equipamento CE-C⁴D construído no laboratório do Prof. Claudimir Lúcio do Lago, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP) (FRANCISCO; DO LAGO, 2009). O equipamento possui dois detectores condutométricos compactos sem contato acoplados capacitivamente. O controle do equipamento e aquisição de dados foram realizados por um programa de computador desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa. Uma imagem do equipamento pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4. Equipamento de Eletroforese Capilar usado nos experimentos (CE-C⁴D).



Fonte: A autora.

As injeções foram feitas no lado direito do equipamento (ânodo), próximo do detector 1 (10 cm). O capilar de sílica fundida utilizado tinha 50 cm de comprimento total, sendo 10 cm de comprimento efetivo até o primeiro detector e 40 cm para o segundo detector. Os diâmetros interno e externo do capilar eram de 50 e 375 μm , respectivamente. Diariamente, antes do início das análises, o capilar foi lavado com NaOH 0,1 mol L⁻¹ durante 15 minutos, logo após com água deionizada durante 10 minutos e finalmente com o BGE utilizado na análise durante 10 minutos. As injeções foram realizadas hidrodinamicamente (1,0 s a uma pressão positiva de 25 kPa) no lado direito do equipamento. O potencial de separação usado em todas as análises foi +25 kV (lado da injeção).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, estudos foram realizados para verificar a possibilidade de determinação rápida e simultânea da TEO e ETI por CE-C⁴D. A ETI é uma molécula (base fraca) que possui carga em uma extensa faixa de pH e pode ser determinada como cátion por CZE (Figura 5). A ETI possui dois pKa's diferentes ($pK_{a1} = 6,98$ e $pK_{a2} = 9,69$) e em solução com $pH < 11,5$, a molécula possui carga positiva.

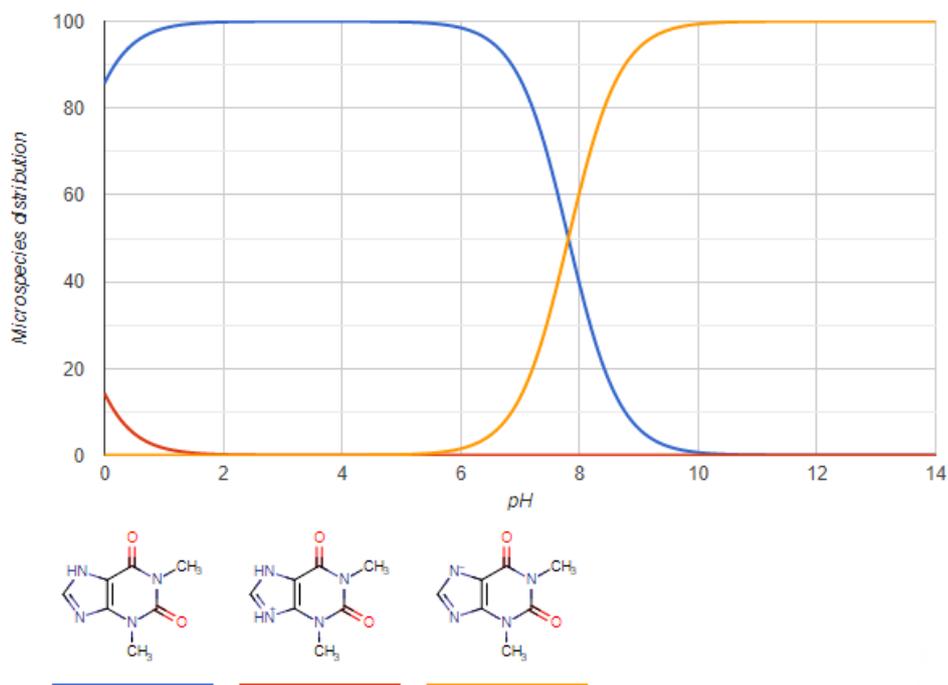
Figura 5. Curva da relação de carga versus pH da molécula da etilenodiamina (ETI).



Fonte: SWAIN, 2012.

A TEO é um ácido fraco e possui $pK_a = 7,82$, portanto, em soluções com o $pH > 7,0$, a molécula vai apresentar carga líquida negativa (ânion), como mostra a Figura 6.

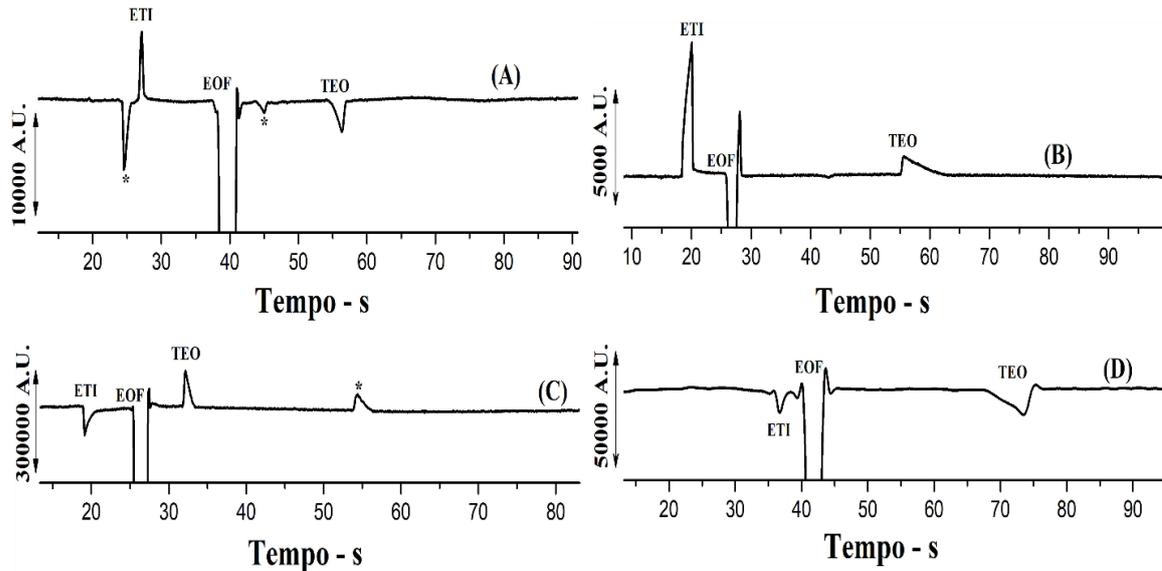
Figura 6. Curva de relação de carga versus pH da molécula de teofilina (TEO).



Fonte: SWAIN, 2012

A estratégia inicial usada nos estudos para a determinação simultânea de ETI e TEO por CZE foi trabalhar com BGE's com valores de pH entre 7,5 e 9,5, pois nessas condições, tanto a ETI (cátion) e a TEO (ânion) possuem cargas. Nesta faixa de pH, quatro BGE's de composições diferentes foram testados: i) 12 mmol L⁻¹ TEA + 20 mmol L⁻¹ DMX + NaOH (pH = 9,0); ii) 20 mmol L⁻¹ TRIS + 20 mmol L⁻¹ TAPS (pH=8,2); (iii) 20 mmol L⁻¹ CHES + NaOH (pH= 9,0); (iv) 20 mmol L⁻¹ ácido fosfórico + NaOH (pH=7,9). A opção por estes BGEs se deve a capacidade tamponante destas soluções na faixa de pH e por serem soluções comumente usadas como BGEs em estudos anteriores usando CE-C⁴D (BERGAMO *et al.*, 2011; E. R. DA SILVA *et al.*, 2013; HUTCHINSON *et al.*, 2008; MARRA *et al.*, 2014; PAUL *et al.*, 2019; PORTO *et al.*, 2014; QUEK *et al.*, 2008; RIAZ; CHUNG, 2006; SÁZELOVÁ *et al.*, 2006). Os eletroferogramas obtidos empregando estes BGEs são apresentados na Figura 7.

Figura 7. Eletroferogramas obtidos com uma solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI usando BGEs de diferentes composições: **(A)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + NaOH (pH=9,0); **(B)** 20 mmol L^{-1} TRIS + 20 mmol L^{-1} TAPS (pH=8,2); **(C)** 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH (pH= 9,0); **(D)** 20 mmol L^{-1} ácido fosfórico + NaOH (pH=7,9). *pico não identificado. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm, respectivamente; potencial aplicado: + 25 kV (lado da injeção); tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).



Os eletroferogramas mostrados na figura 7A (BGE: 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + NaOH; pH = 9,0) e Fig. 7C (BGE: 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH; pH= 9,0) apresentaram melhor definição dos picos, melhor resolução entre a ETI e o EOF e menores tempos de migração. Os BGEs compostos pelos tampões TRIS/TAPS (Figura 7B) e fosfato (Figura 7D) apresentaram desempenhos inferiores (formato de picos e resolução entre ETI e o EOF). Em seguida foi estudado a troca do NaOH por KOH como base para ajuste de pH dos BGE's estudados na Figuras 7A e 7C. Os resultados obtidos nestes estudos são apresentados nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ com os seguintes BGEs: **(a)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(b)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + NaOH (pH=9,0). *pico de sistema. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).

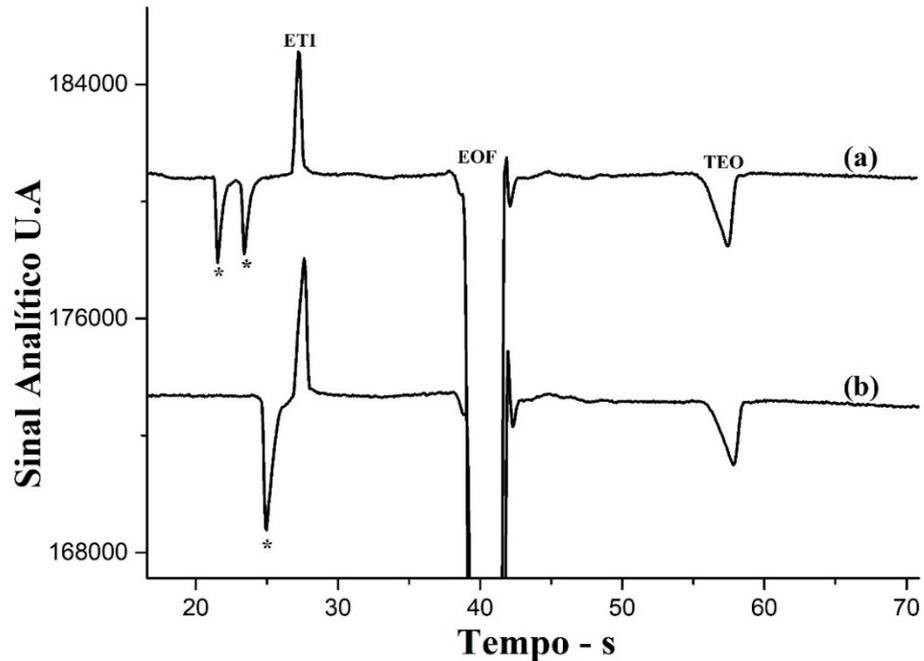
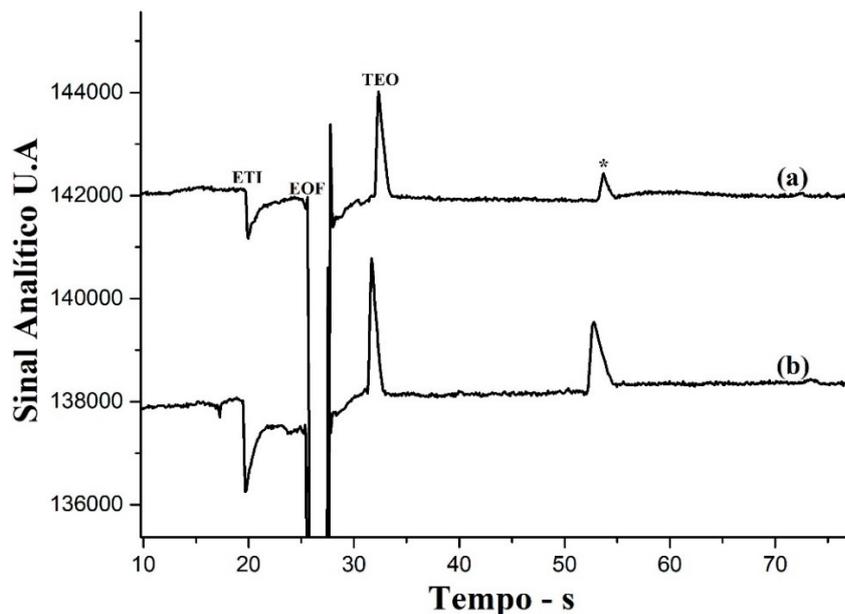
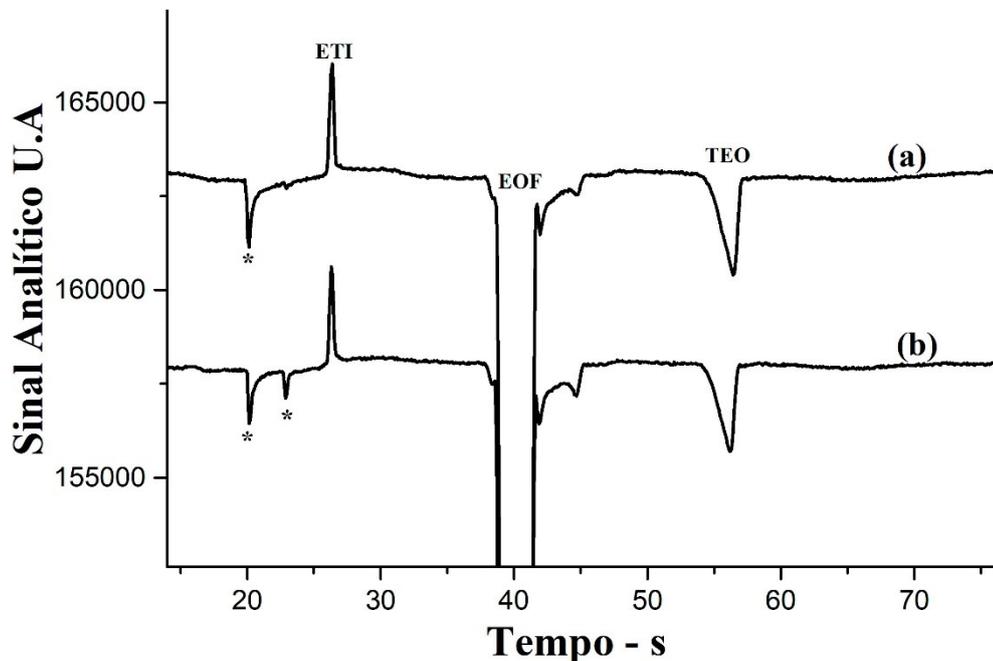


Figura 9. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI com os seguintes BGEs: **(a)** 20 mmol L^{-1} CHES + NaOH (pH= 9,0); e **(b)** 20 mmol L^{-1} CHES + KOH (pH= 9,0). pico de sistema. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).



O BGE composto por 12 mmol L⁻¹ TEA + 20 mmol L⁻¹ DMX + KOH (pH=9,0) foi selecionado para os estudos subsequentes por apresentar melhor resolução entre os picos da ETI e o EOF. O KOH foi utilizado para ajuste do pH, pois o BGE ajustado com NaOH apresentou um possível pico de sistema ou interferente próximo ao pico do ETI. Antes de prosseguir com a otimização da composição do BGE (concentração dos componentes e pH), uma solução padrão e uma solução amostra de concentração similar foram injetadas para verificar se o comportamento da solução amostra seria similar a solução padrão (Figura 10).

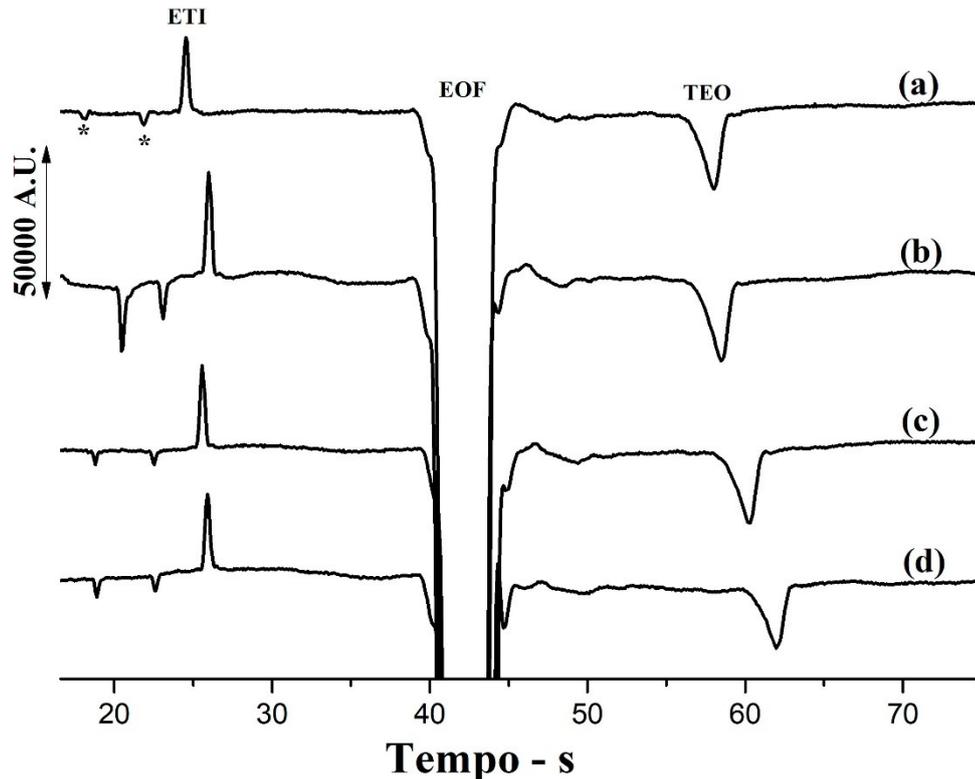
Figura 10. Eletroferogramas obtidos para uma solução (a) padrão (500 μmol L⁻¹) e (b) solução amostra de AMI. BGE: 12 mmol L⁻¹ TEA + 20 mmol L⁻¹ DMX + KOH (pH=9,0). *pico não identificado. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).



Observa-se uma grande similaridade entre os eletroferogramas obtidos com as soluções padrão e amostra (Figura 10). Isto demonstra uma grande possibilidade de obtenção de sucesso na determinação simultânea de ETI e AMI em formulações farmacêuticas. Desta forma prosseguiu-se com as otimizações da composição do BGE selecionado.

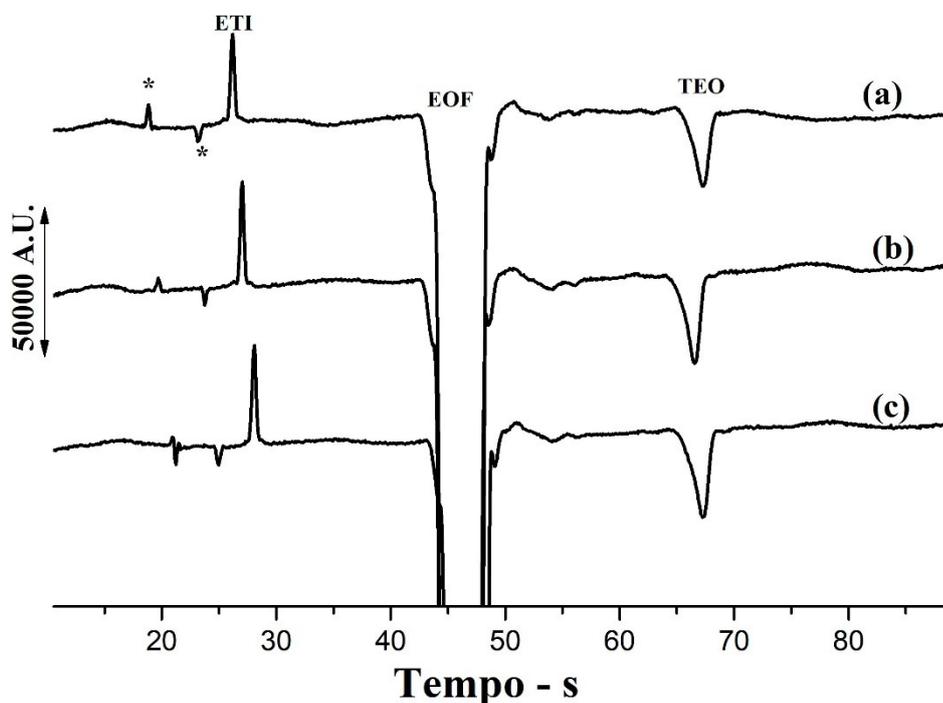
Nesse estudo (Figura 11) variou-se a concentração de TEA em (a) 10 mmol L⁻¹; (b) 12 mmol L⁻¹; (c) 15 mmol L⁻¹ e (d) 20 mmol L⁻¹ com a concentração de DMX fixa em 20 mmol L⁻¹ e sempre usando KOH para ajuste de pH em 9,0.

Figura 11. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI usando BGEs com diferentes concentrações de TEA: **(a)** 10 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(b)** 12 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(c)** 15 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); e **(d)** 20 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0). *pico de sistema. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; Potencial aplicado: 25kV; Tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).



A variação da concentração de TEA não impactou de forma significativa os eletroferogramas obtidos com soluções padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI. Desta forma, o BGE composto por 15 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0) foi selecionado, pois apresentou estabilidade da linha base ligeiramente melhor. Em seguida foi estudado a variação da concentração de DMX na composição do BGE: (a) 20 mmol L^{-1} (b) 22 mmol L^{-1} e (c) 25 mmol L^{-1} . Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na Figura 12.

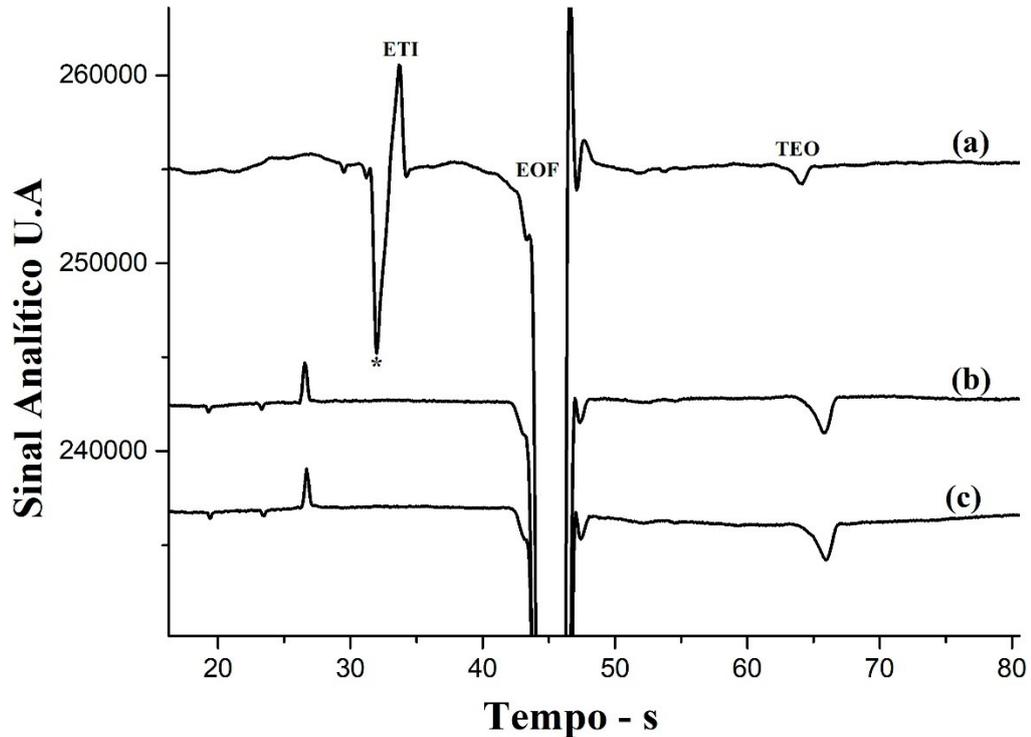
Figura 12. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI com diferentes concentrações de DMX no BGE: **(a)** 15 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); **(b)** 15 mmol L^{-1} TEA + 22 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0); e **(c)** 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH (pH=9,0). *pico não identificado. Comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).



Com base nos eletroferogramas mostrados na Figura 12 foi possível concluir que a variação da concentração de DMX não influenciou os resultados obtidos, desta forma, qualquer uma das concentrações pode ser usada. A concentração de 20 mmol L^{-1} foi selecionada por ser a menor concentração avaliada.

Em seguida foi feito um estudo para otimização do pH (ajustado com KOH) utilizando o BGE composto por 15 mmol L^{-1} TEA + 20 mmol L^{-1} DMX (pH original igual a 8,9). Contudo, para a análise de TEO e ETI é necessário a adição de KOH, para aumentar a condutividade do sistema e obter picos para os analitos, ou seja, a adição de hidróxido ao BGE é fundamental para a determinação dos analitos. Portanto, o pH=9,0 seria o valor mínimo para a faixa de pH. O BGE com pH = 9,7 também foi avaliado a fim de mostrar que o sistema não é estável nessas condições. Os eletroferogramas obtidos estão representados na Figura 13.

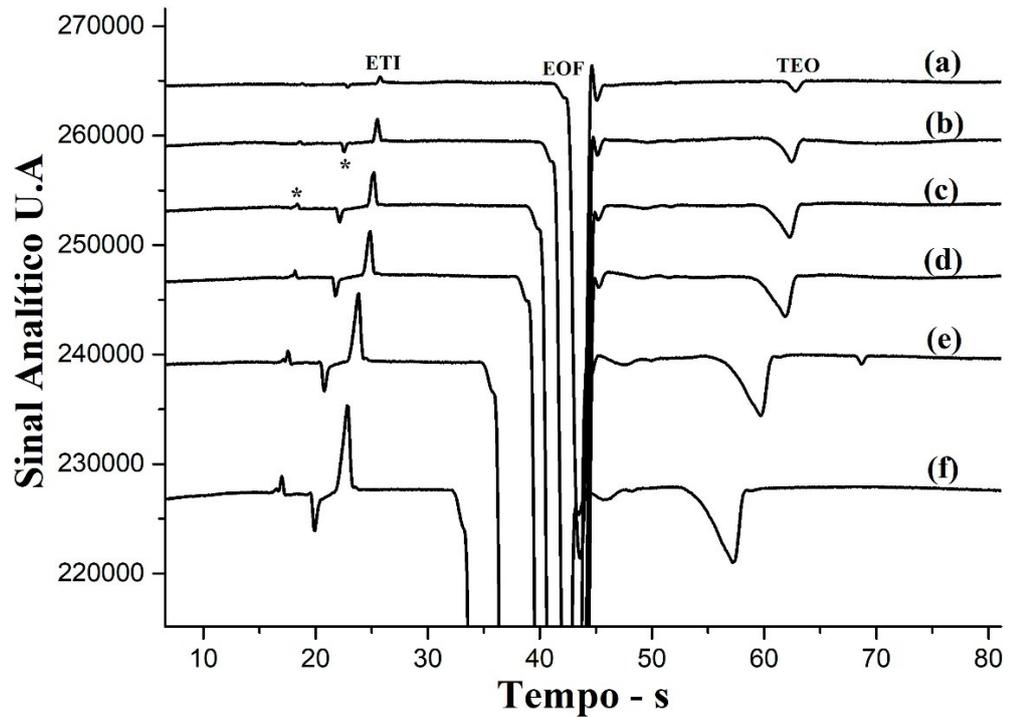
Figura 13. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AMI em função da variação do pH do BGE: (a) pH= 9,7; (b) pH= 9,4; e (c) pH= 9,0. *pico não identificado. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até pH indicado; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 1,0 s (25 kPa).



Com base nos eletroferogramas obtidos, tanto o pH= 9,0 quanto o pH= 9,4 poderiam ser utilizados, já que apresentaram resultados satisfatórios com relação a resolução, estabilidade da linha base e definição do pico, desta forma, a fim de utilizar uma menor quantidade de reagentes, e por estar mais distante do limite tamponante do BGE, o pH=9,0 foi selecionado para os estudos subsequentes.

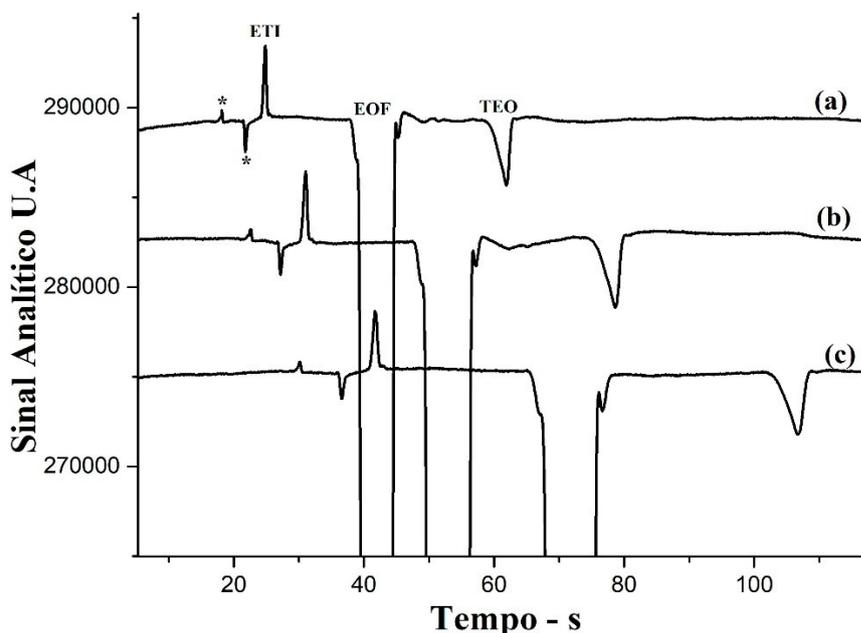
Posteriormente, um estudo para definição do melhor tempo de injeção foi realizado. No intervalo de tempo estudado (0,5 a 4,0s; Figura 14), o tempo de injeção de 2,0s foi selecionado para os estudos posteriores, pois apresentou resolução adequada entre os picos e boa detectabilidade. Tempos de injeção entre 1 e 4 segundos também poderiam ser usados.

Figura 14. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI em função da variação no tempo de injeção a uma pressão constante de 25 kPa: (a) 0,5 s; (b) 1,0 s; (c) 1,5 s; (d) 2,0 s; (e) 3,0 s; e (f) 4,0 s. *pico não identificado. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até $\text{pH}=9,0$; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: +25kV.



Avaliou-se também qual o melhor potencial de separação a ser usado nas análises. Um intervalo entre +15 e +25 kV foi estudado (Figura 15). O potencial escolhido para os estudos posteriores foi de +25 kV, pois apresentou menor tempo de análise.

Figura 15. Eletroferogramas obtidos com solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI em função do potencial de separação empregado: (a) 25kV; (b) 20kV; e (c) 15kV. *pico não identificado. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até pH=9,0; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; tempo de injeção: 2,0 s (25 kPa).



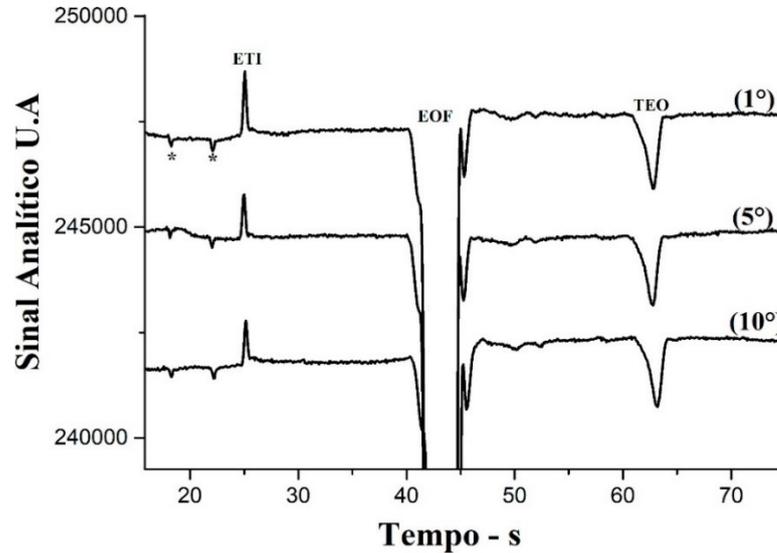
A Tabela 1 apresenta um resumo dos parâmetros estudados e dos respectivos valores otimizados para a determinação simultânea de ETI e TEA utilizando o sistema CE-C⁴D.

Tabela 1. Condições otimizadas para o método CE-C⁴D desenvolvido.

Parâmetros	Faixa avaliada	Valores otimizados
Potencial de separação (kV)	15 – 25	25
Tempo de injeção (s) a 25 kPa	0,5 – 4,0	2,0
pH do BGE	9,0 – 9,7	9,0

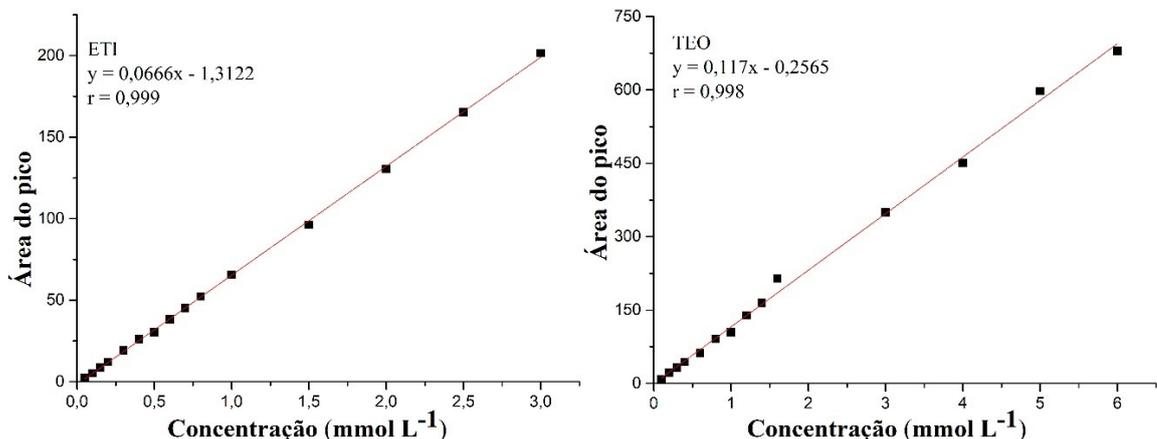
Após a otimização de todos os parâmetros, a estabilidade do método foi estudada a partir de 10 injeções sucessivas de uma solução padrão. Na Figura 16 são apresentados os eletroferogramas obtidos na 1^o, 5^o e 10^o injeção, com uma solução padrão de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI. Os desvios calculados a partir da Figura 16 são apresentados na Tabela 2, mostrando que o método proposto apresenta boa estabilidade, com desvios padrões dentro do limite.

Figura 16. Eletroferogramas obtidos a partir de 10 injeções sucessivas de solução padrão contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMI. BGE: 15 mmol L^{-1} TEA + 25 mmol L^{-1} DMX + KOH até $\text{pH}=9,0$. *pico de sistema; comprimento total e efetivo do capilar: 50 e 10 cm; potencial aplicado: 25kV; tempo de injeção: 2,0 s (25 kPa).



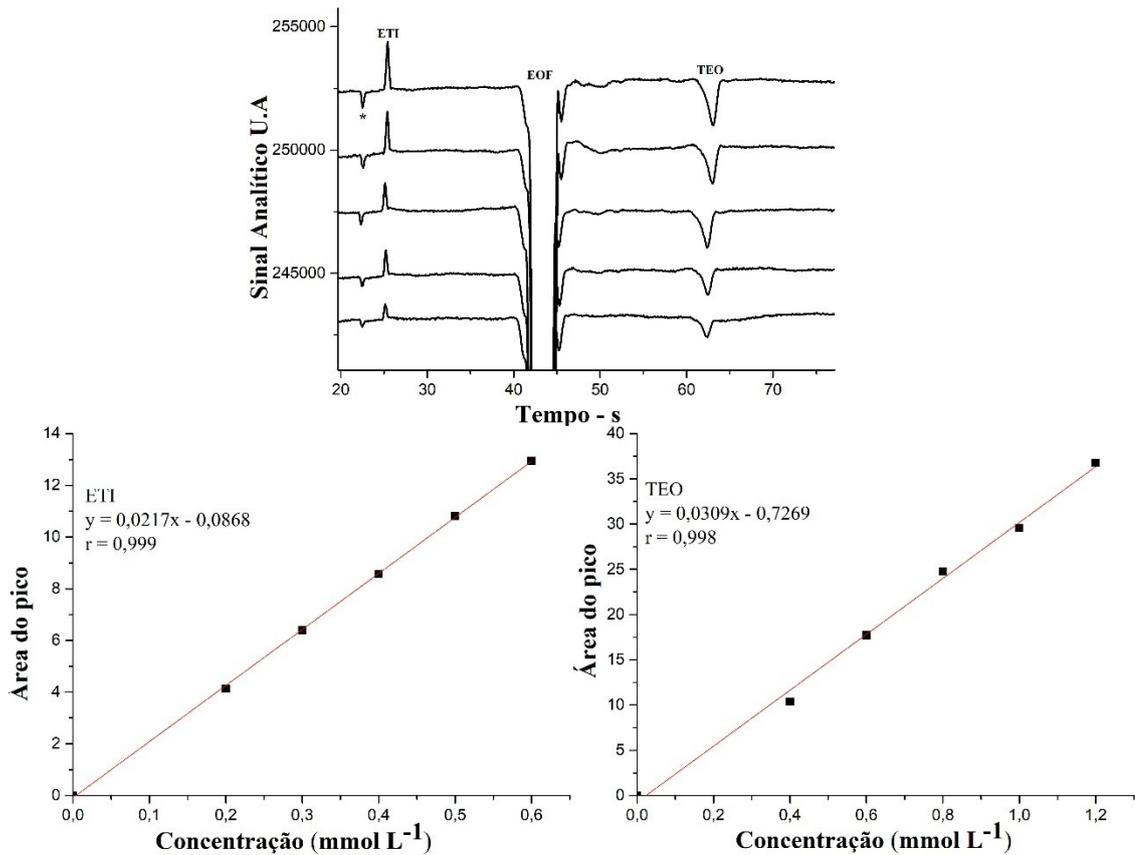
Posteriormente estudos foram realizados para identificar as faixas de concentração onde existe uma relação linear entre concentração e área dos analitos em estudo. Este estudo foi realizado mediante injeções de soluções contendo concentrações crescentes de ETI e TEO. Além disso, manteve-se a relação entre as concentrações de ETI e TEO (1:2) existente nas formulações farmacêuticas. A Figura 17 apresenta as curvas de calibração obtidas para ETI e TEO, respectivamente.

Figura 17. Curvas de calibração obtidas a partir eletroferogramas obtidos com a injeção de soluções padrões com concentrações crescentes de ETI ($0,05\text{-}3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e TEO ($0,1\text{-}6,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Demais condições vide Figura 13.



Posteriormente, uma menor faixa de concentração (a-e) foi selecionada para obter as curvas de calibração para AMI e ETI. Os coeficientes de correlação foram de 0,999 e 0,998 para ETI e TEO, respectivamente, conforme apresentado na Figura 18.

Figura 18. Eletroferogramas obtidos a partir da injeção de soluções padrões contendo concentrações crescentes de ETI (0,2-0,6 mmol L⁻¹) e TEO (0,4-1,2 mmol L⁻¹) e suas respectivas curvas de calibração. Demais condições vide Figura 13.



A Tabela 2 apresenta as características analíticas do método proposto, como o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) que foram calculados a partir do desvio padrão (DP) e a inclinação (I) das curvas de calibração. As injeções foram feitas em triplicata. Os cálculos dos LOD e LOQ foram realizados usando as seguintes equações:

$$LD = \frac{DP}{I} \times 3$$

Equação 3 – Limite de detecção

$$LQ = \frac{DP}{I} \times 10$$

Equação 4 – Limite de Quantificação

Tabela 2 – Características analíticas do método proposto.

Características Analíticas	ETI	TEO
Tempo de migração (s)	25,0 ± 0,2	62,4 ± 0,5
Resolução ^a	6,05 ± 0,24	5,04 ± 0,23
Coefficiente de correlação	0,999	0,998
Linearidade (mmol L ⁻¹)	0,05 - 3,0	0,1 - 6,0
LD (mmol L ⁻¹)	0,011	0,012
LOQ (mmol L ⁻¹)	0,037	0,041
Frequência de injeção (h ⁻¹)	58	58

^a Resolução entre os picos de ETI e TEO e entre o pico da ETI e o EOF.

Por fim, as curvas de calibração (Figura 18) foram utilizadas para analisar duas amostras farmacêuticas e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3. Os estudos de adição e recuperação apresentaram resultados dentro do limite aceitável, com valores de recuperação de $96 \pm 3 \%$ e $99 \pm 2 \%$ para ETI e TEO, respectivamente, indicando a ausência de efeitos matriz nas amostras avaliadas. Além disso, foi observado a inexistência de picos interferentes (por exemplo, excipientes).

Tabela 3 - Comparação dos resultados obtidos na determinação simultânea de ETI e TEO por CE-C⁴D.

Amostra		Bula	CE-C⁴D	Diferença
		(mg L⁻¹)	(mg L⁻¹)	(%)
A1	ETI	18	17,4 ± 0,3	- 3,3
	TEO	216	225,9 ± 0,9	+ 4,6
A2	ETI	24	22,5 ± 0,8	- 6,2
	TEO	288	295,1 ± 0,6	+ 2,5

Desta forma, o método proposto mostrou-se adequado para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo AMI.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto um método simples e rápido (~58 injeções hora) para a determinação simultânea de ETI e TEO em amostras farmacêuticas. O método desenvolvido quando comparado com os métodos convencionais é muito vantajoso, pois além de mais rápido e simples, também é mais barato. O equipamento utilizado para as análises foi fabricado em laboratório, custando cerca de 30 vezes menos que um HPLC, equipamento amplamente utilizado para este tipo de análise. Outro fator importante é o baixo consumo de reagentes, reduzindo consideravelmente o impacto ambiental. Portanto, o método proposto se mostrou um método viável para o controle de qualidade em formulações farmacêuticas.

6 REFERÊNCIAS

- Aragão, N. M. de, Veloso, M. C. da C., Bispo, M. S., & Andrade, J. B. de. (2009). Efeito da acidez e de modificadores orgânicos na determinação de metilxantinas: um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando otimização uni e multivariada. **Química Nova**, *32*(9), 2482–2486. <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900044>>
- Aralihond, A., Shanta, Z., Pullattayil, A., & Powell, C. V. E. (2020). Treating acute severe asthma attacks in children: using aminophylline. **Breathe**, *16*(4), 200081. <<https://doi.org/10.1183/20734735.0081-2020>>
- Bergamo, A. B., Fracassi da Silva, J. A., & de Jesus, D. P. (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Food Chemistry**, *124*(4), 1714–1717. <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.107>>
- Brito-Neto, J. G. A., Fracassi da Silva, J. A., Blanes, L., & do Lago, C. L. (2005). Understanding Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection in Capillary and Microchip Electrophoresis. Part 1. Fundamentals. **Electroanalysis**, *17*(13), 1198–1206. <<https://doi.org/10.1002/elan.200503237>>
- Caldwell, J., Staib, A., Cotgreave, I., & Siebert-Weigel, M. (1986). Theophylline pharmacokinetics after intravenous infusion with ethylenediamine or sodium glycinate. **British Journal of Clinical Pharmacology**, *22*(3), 351–355. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1986.tb02899.x>>
- Calisevici, M. N. et al. Determination of anion and cation contents in Cyprus drinking waters by HPIC method. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 6568, 2011.
- Chen, F., Fang, B., & Wang, S. (2021). A Fast and Validated HPLC Method for Simultaneous Determination of Dopamine, Dobutamine, Phentolamine, Furosemide, and Aminophylline in Infusion Samples and Injection Formulations. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, *2021*, 1–9. <<https://doi.org/10.1155/2021/8821126>>

Costa, B. (2018). **Eletroforese capilar (CE-C4D) aplicada à análise rápida de amônio, difenidramina, arginina, ácido ascórbico e aspartato em formulações farmacêuticas.** [Universidade Federal de Uberlândia]. <<https://doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1170>>

Crafts, C., Bailey, B., Plante, M., & Acworth, I. (2009). Evaluation of Methods for the Simultaneous Analysis of Cations and Anions Using HPLC with Charged Aerosol Detection and a Zwitterionic Stationary Phase. **Journal of Chromatographic Science**, *47*(7), 534–539. <<https://doi.org/10.1093/chromsci/47.7.534>>

Da Silva, E. R., Segato, T. P., Coltro, W. K. T., Lima, R. S., Carrilho, E., & Mazo, L. H. (2013). Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, *34*(14), 2107–2111. <<https://doi.org/10.1002/elps.201200588>>

De Blaey, C. J., Varkevisser, F. A., & Kalk, A. (1984). Pulsed proton NMR and solid-liquid fat ratio determinations in suppository vehicles and aminophylline suppositories. **Pharmaceutisch Weekblad**, *6*(5), 203–208. <<https://doi.org/10.1007/BF01999943>>

de Fabrizio, F. (1977). UV Spectrophotometric Determination of Aminophylline, Amobarbital, and Ephedrine Hydrochloride in an Antiasthma Capsule Preparation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, *66*(6), 811–813. <<https://doi.org/10.1002/jps.2600660617>>

Deml, M., Foret, F., & Boček, P. (1985). Electric sample splitter for capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, *320*(1), 159–165. <[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)90491-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)90491-1)>

Doukky, R., Morales Demori, R., Jain, S., Kiriakos, R., Mwansa, V., & Calvin, J. E. (2012). Attenuation of the side effect profile of regadenoson: A randomized double-blinded placebo-controlled study with aminophylline in patients undergoing myocardial perfusion imaging. “The ASSUAGE trial”. **Journal of Nuclear Cardiology**, *19*(3), 448–457. <<https://doi.org/10.1007/s12350-012-9533-x>>

FARMACOPÉIA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 2010. V.1.

Fracassi da Silva, J. A., & do Lago, C. L. (1998). An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, 70(20), 4339–4343. <<https://doi.org/10.1021/ac980185g>>

Fracassi da Silva, J. A., & do Lago, C. L. (2000). Conductivity detection of aliphatic alcohols in micellar electrokinetic chromatography using an oscillometric detector. **Electrophoresis**, 21(7), 1405–1408. <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1405::AID-ELPS1405>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1405::AID-ELPS1405>3.0.CO;2-O)>

Francisco, K. J. M., & do Lago, C. L. (2009). A compact and high-resolution version of a capacitively coupled contactless conductivity detector. **Electrophoresis**, 30(19), 3458–3464. <<https://doi.org/10.1002/elps.200900080>>

Ge, J., Tong, F., Li, Y., Zhang, Y., Chu, Q., & Ye, J. (2013). Fast Determination of Ethylenediamine in Aminophylline Tablets by Small-sized Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection. **Chinese Journal of Chemistry**, 31(4), 525–528. <<https://doi.org/10.1002/cjoc.201300039>>

Griffenhagen, G. B., & Brady, E. S. (1951). Notes on the determination of theophylline, alone and in combinations, by the U. S. P. aminophylline method. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)**, 40(4), 211–212. <<https://doi.org/10.1002/jps.3030400413>>

Hjertén, S. (1967). Free zone electrophoresis. **Chromatographic Reviews**, 9(2), 122–219. <[https://doi.org/10.1016/0009-5907\(67\)80003-6](https://doi.org/10.1016/0009-5907(67)80003-6)>

Hjertén, S. (1983). High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 270, 1–6. <[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96347-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96347-2)>

Hutchinson, J. P., Johns, C., Breadmore, M. C., Hilder, E. F., Guijt, R. M., Lennard, C., Dicoski, G., & Haddad, P. R. (2008). Identification of inorganic ions in post-blast explosive residues using portable CE instrumentation and capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, 29(22), 4593–4602. <<https://doi.org/10.1002/elps.200800226>>

IBGE. Em 2017, expectativa de vida era de 76 anos | Agência de Notícias. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia->

de-noticias/releases/23200-em-2017-expectativa-de-vida-era-de-76-anos. Acesso em: 15 nov. 2022.

ISHIGURO, Y., TAMEGAI, T., SAWADA, M., TANAKA, Y., & KAWABE, K. (1980). Determination of Ethylenediamine in Aminophylline by High Performance Liquid Chromatography. **Yakugaku Zasshi**, *100*(5), 576–579. <https://doi.org/10.1248/yakushi1947.100.5_576>

Jager, A. v, & Tavares, M. F. M. (2001). Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Revisão Química Nova**, *24*(3), 363–373.

Klimovic, S., Scurek, M., Pesl, M., Beckerova, D., Jelinkova, S., Urban, T., Kabanov, D., Starek, Z., Bebarova, M., Pribyl, J., Rotrekl, V., & Brat, K. (2022). Aminophylline Induces Two Types of Arrhythmic Events in Human Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. **Frontiers in Pharmacology**, *12*. <<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.789730>>

Koenka, I. J., Mai, T. D., Hauser, P. C., & Sáiz, J. (2016). Simultaneous separation of cations and anions in capillary electrophoresis – recent applications. **Analytical Methods**, *8*(7), 1452–1456. <<https://doi.org/10.1039/C5AY02917A>>

Lanças, F. M. (2013). A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, *5*(1), 27–46. <<https://doi.org/10.4322/sc.2013.005>>

Lau-cam, C. A., & Roos, R. W. (1991). Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Determination of Theophylline and Ethylenediamine in Aminophylline Dosage Forms as Their Dansyl Derivatives. **Journal of Liquid Chromatography**, *14*(10), 1939–1956. <<https://doi.org/10.1080/01483919108049664>>

Lei, Y. H. (2014). Determination of Vitamin and Aminophylline by a Method of PLS. **Advanced Materials Research**, *881–883*, 493–496. <<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.881-883.493>>

Li, Q., & Zhang, H. (2008). A novel spectrophotometric method for the determination of aminophylline in pharmaceutical samples in the presence of methanol. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, *70*(2), 284–289. <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.07.056>>

Li, Q., Zhang, T., & Lv, W. (2009). A novel spectrophotometric method for the determination of aminophylline with boric acid in pharmaceutical and mixed serum samples. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44(4), 1452–1456. <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.046>>

Marra, M. C. (2018). **Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)** [Universidade Federal de Uberlândia]. <<https://doi.org/10.14393/ufu.te.2018.806>>

Marra, M. C., Silva, P. L., Muñoz, R. A. A., & Richter, E. M. (2014). Ultra-Fast Determination of Scopolamine, Orphenadrine, Mepyramine, Caffeine, Dipyrone, and Ascorbic Acid by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25(5), 913–919. <<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140061>>

MENG, H., WANG, T., GUO, B., HASHI, Y., GUO, C., & LIN, J. (2008). Simultaneous determination of inorganic anions and cations in explosive residues by ion chromatography. **Talanta**, 76(2), 241–245. <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.054>>

Nehmé, R., Lascaux, A., Delépée, R., Claude, B., & Morin, P. (2010). Capillary electrophoresis procedure for the simultaneous analysis and stoichiometry determination of a drug and its counter-ion by using dual-opposite end injection and contactless conductivity detection: Application to labetalol hydrochloride. **Analytica Chimica Acta**, 663(2), 190–197. <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.032>>

Nova Acta Regional Societatis Scientist Upsaliensis, v.7, n. 4, p. 107, 1930.

Oliveira, T. (2019). **Determinação de escopolamina em bebidas e urina empregando voltametria de onda quadrada e eletroforese capilar** [Universidade Federal de Uberlândia]. <<https://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2346>>

Paul, P., Reynaert, J., Sängner-van de Griend, C., Adams, E., & van Schepdael, A. (2019). Development and Validation of a CE Method for the Determination of Tetracyclines with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Chromatographia**, 82(9), 1395–1403. <<https://doi.org/10.1007/s10337-019-03755-4>>

Porto, S. K. S. S., Nogueira, T., Blanes, L., Doble, P., Sabino, B. D., do Lago, C. L., & Angnes, L. (2014). Analysis of *Ecstasy* Tablets Using Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Journal of Forensic Sciences**, *59*(6), 1622–1626. <<https://doi.org/10.1111/1556-4029.12573>>

Quek, N. M., Law, W. S., Lau, H. F., Zhao, J. H., Hauser, P. C., & Li, S. F. Y. (2008). Determination of pharmaceuticals classified as emerging pollutants using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, *29*(17), 3701–3709. <<https://doi.org/10.1002/elps.200800153>>

Riaz, A., & Chung, D. S. (2006). Calibration of migration times of variable salinity samples with internal standards in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, *27*(3), 553–562. <<https://doi.org/10.1002/elps.200500595>>

Ribeiro, C. A. M. M. (2022). **Desenvolvimento de métodos eletroquímico e por eletromigração para determinação de zinco, ácido ascórbico, escopolamina e brometo de butilescopolamina em amostras farmacêuticas e de interesse forense** [Universidade Federal de Uberlândia]. <<https://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.69>>

Ribeiro, C. A. M. M. (2017). **Desenvolvimento de métodos rápidos de análises de fármacos por eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C4D)**. [Universidade Federal de Uberlândia]. <<http://doi.org/10.14393/ufu.di.2017.393>>

Roloof, F. B. (2006). **Determinação eletroanalítica de teofilina em produto farmacêutico**. [Universidade Federal de Santa Catarina].

Sázelová, P., Kašička, V., Šolínová, V., & Koval, D. (2006). Determination of purity degree and counter-ion content in leirelin by capillary zone electrophoresis and capillary isotachopheresis. **Journal of Chromatography B**, *841*(1–2), 145–151. <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.006>>

Silva, J. A. F. da. (2003). Detecção eletroquímica em eletroforese capilar. **Química Nova**, *26*(1), 56–64. <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100012>>

SWAIN, M. Software review. *Chemical Information Modeling*, v. 52, p. 613-615, 2012.

Swinney, K., & Bornhop, D. J. (2000). Detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, *21*(7), 1239–1250. <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:7<1239::AID-ELPS1239>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:7<1239::AID-ELPS1239>3.0.CO;2-6)>

Tamizi, E., & Jouyban, A. (2015). The potential of the capillary electrophoresis techniques for quality control of biopharmaceuticals-A review. **Electrophoresis**, *36*(6), 831–858. <<https://doi.org/10.1002/elps.201400343>>

Tavares, M. F. M. (1995). Eletroforese Capilar - Conceitos Básicos. **Química Nova**, *19*(2), 173–181.

Tavares, M. F. M. (1997). Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, *20*(5), 493–511. <<https://doi.org/10.1590/S0100-40421997000500010>>

TISELIUS, A. The Moving Boundary Method of studying the electrophoresis of proteins.

Turczan, J. W., Goldwitz, B. A., & Nelson, J. J. (1972). Nuclear magnetic resonance analysis of pharmaceuticals I—VII Determination of aminophylline in tablets. **Talanta**, *19*(12), 1549–1554. <[https://doi.org/10.1016/0039-9140\(72\)80227-3](https://doi.org/10.1016/0039-9140(72)80227-3)>

Van der, C., Evcraerts, F. M., Verheggen, Th. P. E. M., & Poullis, J. A. (1972). A.c. conductivity measurements in isotachopheresis. **Analytica Chimica Acta**, *59*(2), 298–301. <[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)95095-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)95095-0)>

Wang, M., Tian, B., Xue, Y., Li, R., Zhai, T., & Tan, L. (2020). Determination of aminophylline based on fluorescence quenching of amino-functionalized graphene quantum dots induced by photoilluminated riboflavin-aminophylline system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, *235*, 118306. <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118306>>

Wang, R., Wu, J., Wang, L., Wang, R., & Dou, H. (2013). CdTe quantum dots as fluorescence sensor for the determination of aminophylline in aqueous solution. **Optics and Spectroscopy**, *115*(4), 596–600. <<https://doi.org/10.1134/S0030400X13100147>>

Wang, Z., Zhang, Z., Fu, Z., Luo, W., & Zhang, X. (2004). Flow-injection chemiluminescence determination of aminomethylbenzoic acid and aminophylline based on N-bromosuccinimide–luminol reaction. **Talanta**, *62*(3), 611–617. <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.09.005>>

Weekley, B. S., & Foley, J. P. (2007). Dual-opposite-injection CZE: Theoretical aspects and application to organic and pharmaceutical compounds. **Electrophoresis**, *28*(4), 697–711. <<https://doi.org/10.1002/elps.200600608>>

Ye, C., Miao, C., Yu, L., Dong, Z., Zhang, J., Mao, Y., Lu, X., & Lyu, Q. (2019). Factors affecting the efficacy and safety of aminophylline in treatment of apnea of prematurity in neonatal intensive care unit. **Pediatrics & Neonatology**, *60*(1), 43–49. <<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2018.03.008>>

Yin, C., Tang, C., & Wu, X. (2003). HPLC determination of aminophylline, methoxyphenamine hydrochloride, noscapine and chlorphenamine maleate in compound dosage forms with an aqueous-organic mobile phase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, *33*(1), 39–43. <[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00352-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00352-2)>

ZAHN, H. Über das Leitvermögen von starken Elektrolyten für Hochfrequenzströme, **Zeitschrift für Physik**, v. 51, n. 5, p. 350-354, 1928.

Zatloukal, J., Brat, K., Neumannova, K., Volakova, E., Hejduk, K., Kocova, E., Kudela, O., Kopecky, M., Plutinsky, M., & Koblizek, V. (2020). Chronic obstructive pulmonary disease - diagnosis and management of stable disease; a personalized approach to care, using the treatable traits concept based on clinical phenotypes. Position paper of the Czech Pneumological and Phthisiological Society. **Biomedical Papers**, *164*(4), 325–356. <<https://doi.org/10.5507/bp.2020.056>>

Zemann, A. J. (2003). Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, *24*(1213), 2125–2137. <<https://doi.org/10.1002/elps.200305476>>

Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., & Bonn, G. K. (1998). Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, *70*(3), 563–567. <<https://doi.org/10.1021/ac9707592>>

Zhang, H., & Stewart, J. T. (1994). Determination of a Cefuroxime and Aminophylline/Theophylline Mixture by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, *17*(6), 1327–1335. <<https://doi.org/10.1080/10826079408013766>>