UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DE FÁRMACOS EM MEDICAMENTOS
POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA COM FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL

Anil Kumar Singh

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:
Profª. Titular Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2002

J7 648

Anil Kumar Singh

SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DE FÁRMACOS EM MEDICAMENTOS
POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA COM FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Titular Dr. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
orientador/presidente

1º. examinador (Prof. Graciliano de Oliveira Neto)

2º. examinador (Profa. Maria Vitória Lopes Badra Bentley)

3º. examinador (Profa. Palmira D. Gremião)

4º. examinador (Prof. Luiz Fernando Lopes Guimarães)

São Paulo, 21 de Janeiro de 2002

*Aos meus pais, RAJESH SINGH e YASHPAL SINGH,
aos meus irmãos pelo amor, dedicação e força durante esses anos todos*

À Prof^a Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pela orientação, amizade, incentivo e apoio constantes durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

À Profª Titular Dra. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann, pelas sugestões, orientação e estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Titular Dr. João Fernando Magalhães e Prof. Dr. Jorge Luis S. Martins pelo incentivo e estímulo durante realização deste trabalho.

À Profª Drª Maria Amélia Barata da Silveira pelo apoio constante durante esses anos todos. Especialmente, pelo estímulo e orientação na fase inicial do curso de Pós-Graduação nesta Universidade.

À Profª Titular Drª Teresinha de Jesus Andreoli Pinto, pela amizade, apoio e incentivos durante realização deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos e da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, pela atenção e apoio durante o período da realização deste trabalho.

Às funcionárias do laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, pela atenção e apoio.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, pela colaboração e amizade.

Aos bibliotecários e todos os funcionários do conjunto das Químicas, Universidade de São Paulo, pela cuidadosa revisão das referências bibliográficas e pelo constante apoio.

Ao Dr. Louis Glunz, Regis Technologies Inc. Estados Unidos, pelo fornecimento da Fase Estacionária Quiral, α -Burke 2^º.

Ao Dr. Paul K. Owens, AstraZeneca R&D, Mölndal, Suíça, pelo fornecimento do padrão R-metoprolol e S-metoprolol.

À Indústria Farmacêutica União Química Farmacêutica, Novartis Biociências S. A. e ZENECA Farmacêutica do Brasil Ltda. pelo fornecimento da matéria prima e amostras farmacêuticas do ibuprofeno, metoprolol e atenolol respectivamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM FASE QUIRAL (CLAE-FQ)	6
2.1.1 MÉTODO DE SEPARAÇÃO E MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS SEPARAÇÕES ENANTIOMÉRICAS	6
2.1.1.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE DIASTEREISÔMEROS	7
2.1.1.2 RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA COM UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS QUIRAIS NA FASE MÓVEL	8
2.1.1.2.1 TROCA DE LIGANTES	9
2.1.1.2.2 PAR IÔNICO	10
2.1.1.2.3 INCLUSÃO (CAVIDADE)	11
2.1.1.3 RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA COM UTILIZAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS (COLUNAS QUIRAIS)	13
2.1.1.3.1 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO PIRKLE	16
2.1.1.3.1 (a) α -BURKE-2 [®]	16
2.1.1.3.1 (b) WHELK-O 1 [®]	18
2.1.1.3.2 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO PROTEÍNA	21
2.1.1.3.2.1 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ALBUMINAS	22
(a) Albumina sérica bovina	22
(b) Albumina sérica humana	22
2.1.1.3.2.2 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ALBUMINAS GLICOPROTEÍNAS	23
(a) α_1 -Ácido glicoproteína (AGP)	23
(b) Ovomucoide e ovoglicoproteína	23
2.1.1.3.2.3 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ENZIMAS	24

(a) Tripsina e α -quimiotripsina	24
(b) Celulase	24
(c) Lisozima	25
(d) Pepsina	25
(e) Amiloglicosidase	25
2.1.1.3.3 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO CAVIDADE OU INCLUSÃO	27
2.1.1.3.3. (a) FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO CICLODEXTRINA (CHIRADEX [®])	28
2.1.1.3.3. (b) FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO CELULOSE (CHIRALCEL OD [®])	30
2.1.1.3.4 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO ANTIBIÓTICOS MACROCÍCLICOS	35
2.2 β -BLOQUEADORES	39
2.3 ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES	49
2.3.1 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO IBUPROFENO	55
2.3.2 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO FLURBIPROFENO	57
2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	61
3. JUSTIFICATIVA	65
4. OBJETIVOS	68
5. MATERIAIS E MÉTODOS	69
5.1 MATERIAIS	69
5.1.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E SOLVENTES	69
5.1.2 FÁRMACOS PADRÃO	70
5.1.3 AMOSTRAS	71
5.1.4 EQUIPAMENTOS	72
5.2 MÉTODOS	74
5.2.1 DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO	74
5.2.2 ESTUDOS PRELIMINARES PARA OS β -BLOQUEADORES	75
5.2.2.1 SEPARAÇÕES DOS ISÔMEROS DOS β -BLOQUEADORES	75
5.2.2.1.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DOS β -BLOQUEADORES	75

5.2.2.2 SEPARAÇÕES DOS ISÔMEROS DOS ANTINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES	76
5.2.2.2.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DOS ANTINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES	76
5.2.2.3 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA CHIRALCEL OD®	77
5.2.2.4 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA CHIRADEX®	77
5.2.2.5 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA α -BURKE 2®	78
5.2.2.6 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA WHELK-O 1®	78
5.2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SELECIONADO PARA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO ATENOLOL	79
5.2.3.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	79
5.2.3.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS (R)- E (S)- ATENOLOL EM COMPRIMIDOS	80
5.2.3.2.1 PESQUISA DE INTERFERENTES DOS EXCIPIENTES A PARTIR DOS PLACEBOS	80
5.2.3.2.2 PREPARAÇÃO DOS PLACEBOS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D	80
5.2.3.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO ATRAVÉS DA REPETIBILIDADE (“INTER-DIA”)	81
5.2.3.3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE R-ATENOLOL (100,0 $\mu\text{g/mL}$) E DE S-ATENOLOL (100,0 $\mu\text{g/mL}$)	81
5.2.3.3.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D	82
5.2.3.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO	82
5.2.3.4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE (R, S)-ATENOLOL (500,0 $\mu\text{g/mL}$)	83
5.2.3.4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D	83
5.2.3.4.3 PROCEDIMENTO	84
5.2.3.4.3.1 CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA DE PADRÃO	85

5.2.3.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DO R- ATENOLOL E DO S-ATENOLOL	86
5.2.3.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO	86
5.2.3.5.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	86
5.2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SELECIONADO PARA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO METOPROLOL	87
5.2.4.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	87
5.2.4.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS (R)- E (S)- METOPROLOL EM COMPRIMIDOS	88
5.2.4.2.1 PESQUISA DE INTERFERENTES DOS EXCIPIENTES A PARTIR DOS PLACEBOS	88
5.2.4.2.2 PREPARAÇÃO DO PLACEBO DA AMOSTRA COMERCIAL E	88
5.2.4.3 AVALIAÇÃO DA PRECISÃO ATRAVÉS DA REPETIBILIDADE (“INTER-DIA”)	89
5.2.4.3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE R-METOPROLOL (100,0 µg/mL) E DE S-METOPROLOL (100,0 µg/mL)	89
5.2.4.3.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL E	89
5.2.4.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO	90
5.2.4.4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE (R, S)-METOPROLOL (400,0 µg/mL)	90
5.2.4.4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL E	91
5.2.4.4.3 PROCEDIMENTO	91
5.2.4.4.3.1 CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA DE PADRÃO	92
5.2.4.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DO R- METOPROLOL E DO S-METOPROLOL	93
5.2.4.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO	93
5.2.4.5.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	93
5.2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SELECIONADO PARA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO FLURBIPROFENO	94
5.2.5.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE S-FLURBIPROFENO	94

5.2.5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DO ISÔMERO (S)- FLURBIPROFENO EM AMOSTRA COMERCIAL	96
5.2.5.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO ATRAVÉS DA REPETIBILIDADE (“INTER-DIA”)	96
5.2.5.3.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA TESTE DE REPRODUTIBILIDADE	96
5.2.5.3.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL F PARA TESTE DE REPRODUTIBILIDADE	96
5.2.5.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO	97
5.2.5.4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE (R, S)-FLURBIPROFENO (40,00 µg/mL)	97
5.2.5.4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL F	98
5.2.5.4.3.1 CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA DE PADRÃO	99
5.2.5.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DO S-FLURBIPROFENO	100
5.2.5.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO	100
5.2.5.5.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	100
6. RESULTADOS	101
6.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO	101
6.2.1 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO METOPROLOL	105
6.2.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ATENOLOL	111
6.2.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO PINDOLOL	117
6.2.4 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO BETAXOLOL	123
6.2.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO NADOLOL	125
6.3.1 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO IBUPROFENO	130
6.3.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FLURBIPROFENO	148
6.4 DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO ATENOLOL	164
6.4.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	165
6.4.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE (R,S)-ATENOLOL EM AMOSTRAS COMERCIAIS	166
6.4.3 TESTE DE PRECISÃO DO MÉTODO	168
6.4.4 TESTES DE RECUPERAÇÃO	170

6.5 DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO METOPROLOL	172
6.5.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	173
6.5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE (R,S)-METOPROLOL EM AMOSTRAS COMERCIAIS	174
6.5.3 TESTE DE PRECISÃO DO MÉTODO	176
6.5.4 TESTES DE RECUPERAÇÃO	178
6.6 DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO FLURBIPROFENO	179
6.6.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	180
6.6.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE (R,S)-FLURBIPROFENO EM AMOSTRAS COMERCIAIS	181
6.6.3 TESTE DE PRECISÃO DO MÉTODO	182
6.6.4 TESTES DE RECUPERAÇÃO	184
7. DISCUSSÃO	186
7.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO	187
7.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS β -BLOQUEADORES	189
7.2.1 SEPARAÇÕES COM COLUNA DO TIPO CHIRALCEL OD [®]	189
7.2.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO METOPROLOL	193
7.2.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ATENOLOL	197
7.2.4 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO PINDOLOL	200
7.2.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO BETAXOLOL	205
7.2.6 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO NADOLOL	207
7.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES	210
7.3.1 SEPARAÇÃO UTILIZANDO COLUNA DO TIPO CHIRALCEL OD [®]	210
7.3.2 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES UTILIZANDO COLUNA DO TIPO CHIRADEX [®]	212
7.3.3 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES UTILIZANDO COLUNA DO TIPO α -BURKE 2 [®]	215
7.3.4 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES UTILIZANDO COLUNA DO TIPO (S, S)-WHELK-O 1 [®]	216

7.3.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO IBUPROFENO	217
7.3.6 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FLURBIPROFENO	223
7.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-FEQ)	228
7.4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO ATENOLOL	229
7.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO METOPROLOL	231
7.4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO FLURBIPROFENO	233
7.4.4 RELAÇÃO ENTRE OS ISÔMEROS DO ATENOLOL, DO METOPROLOL E DO FLURBIPROFENO	235
8. CONCLUSÕES	236
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	240
10. PUBLICAÇÕES	260
10.1 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS	260
10.2 TRABALHOS E RESUMOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS	263

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1. Agentes bloqueadores β -adrenérgicos	41
QUADRO 2. Estruturas químicas, enantiômeros e nomes químicos dos agentes antiinflamatórios não-esteróides selecionados para a pesquisa.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Desenvolvimento dos métodos cromatográficos e eletroforéticos para separação enantiomérica de compostos químicos	3
FIGURA 2. Projeções computadorizadas da estrutura dos complexos de inclusão, a) d-propranolol e b) l-propranolol em β -ciclodextrinas resultantes da cristalografia de raio X. As linhas pontilhadas representam as ligações potenciais de hidrogênio	12
FIGURA 3. Interações em três pontos propostas por BACZUK e colaboradores para explicar a separação dos enantiômeros da DOPA (diidroxifenilalanina) (a), em uma FEQ derivada da L-arginina (b)	14
FIGURA 4. Teoria de quatro pontos de ligação (reconhecimento estereoespecífico)	15
FIGURA 5. Etapas envolvidas no processo de reconhecimento quiral	15
FIGURA 6. Estrutura da fase estacionária quiral (S, S) α -Burke-2 [®]	17
FIGURA 7. Representação esquemática do reconhecimento quiral com a FEQ do tipo π -receptor	17
FIGURA 8. Estrutura da fase estacionária quiral (R, R)-Whelk-O 1 [®] e (S, S)-Whelk-O 1 [®]	18
FIGURA 9. Representação esquemática de três pontos de ligação envolvidos na separação enantiomérica dos enantiômeros dos antiinflamatórios não-esteróides com a FEQ do tipo (S, S)-Whelk-O 1 [®]	19
FIGURA 10. Representação esquemática da separação por diferença de energia dos complexos diastereoisoméricos transitórios	27
FIGURA 11. Encaixe do soluto na cavidade da β -ciclodextrina	29
FIGURA 12. Estereoquímica estrutural da fase estacionária quiral do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil (Chiralcel OD [®]) e possíveis ligações necessárias para reconhecimento quiral do atenolol e do metoprolol	32
FIGURA 13. Estrutura química de glicopeptídeos macrocíclicos (a) Vancomicina (Chirobiotic V [®]), (b) Teicoplanin (Chirobiotic T [®])	36
FIGURA 14. Fórmula geral dos agentes bloqueadores β -adrenérgicos	40

FIGURA 15. Fórmula geral dos agentes antiinflamatórios não-esteróides	50
FIGURA 16. Inversão quiral do ibuprofeno (R-ibuprofeno $\Leftrightarrow$ S- ibuprofeno)	53
FIGURA 17. Estrutura estereoespecífica do (R) e do (S)-flurbiprofeno, mostrando a conformação espacial da molécula	57
FIGURA 18. Espectro de absorção no UV do metoprolol (80,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	101
FIGURA 19. Espectro de absorção no UV do betaxolol (80,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	102
FIGURA 20. Espectro de absorção no UV do pindolol (80,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	102
FIGURA 21. Espectro de absorção do atenolol 80,00 $\mu\text{g/mL}$ em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	103
FIGURA 22. Espectro de absorção no UV do nadolol (80,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	103
FIGURA 23. Espectro de absorção no UV do ibuprofeno (16,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	104
FIGURA 24. Espectro de absorção no UV do flurbiprofeno (16,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)	104
FIGURA 25. Cromatogramas do atenolol	164
FIGURA 26. Curva de calibração do R-atenolol	165
FIGURA 27. Curva de calibração do S-atenolol	165
FIGURA 28. Cromatogramas das amostras A, B, C e D contendo R, S-atenolol	166
FIGURA 29. Cromatogramas do metoprolol	172
FIGURA 30. Curva de calibração do R-metoprolol	173
FIGURA 31. Curva de calibração do S-metoprolol	173
FIGURA 32. Cromatogramas da amostra contendo R, S-metoprolol e dos placebos da amostra	174
FIGURA 33. Cromatograma do flurbiprofeno, (a) S-flurbiprofeno (6,000 $\mu\text{g/mL}$) (Padrão) ; (b) (R/S)-flurbiprofeno (12,00 $\mu\text{g/mL}$) (Amostra F)	179
FIGURA 34. Curva de calibração do S-flurbiprofeno	180
FIGURA 35. Interação entre a fase estacionária quiral da coluna Chiralcel OD [®] e os β -Bloqueadores	190

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Colunas quirais do tipo “Brush” (tipo Pirkle) disponíveis no comércio	20
TABELA 2. Colunas quirais do tipo proteína disponíveis no comércio	26
TABELA 3. Propriedades físicas das ciclodextrinas (CD)	28
TABELA 4. Colunas quirais do tipo cavidade disponíveis no comércio	29
TABELA 5. Colunas quirais do tipo polímeros helicoidais disponíveis no comércio	34
TABELA 6. Interações e forças relativas envolvidas no processo de reconhecimento quiral por Chirobiotic V [®]	37
TABELA 7. Colunas quirais do tipo antibiótico macrocíclico disponíveis no comércio	38
TABELA 8. Medicamentos contendo β -bloqueadores na forma racêmica comercializados no Brasil e selecionados para a pesquisa	42
TABELA 9. Separações do metoprolol segundo a literatura	44
TABELA 10. Separações do betaxolol segundo a literatura	45
TABELA 11. Separações do pindolol segundo a literatura	46
TABELA 12. Separações do nadolol segundo a literatura	47
TABELA 13. Separações do atenolol segundo a literatura	48
TABELA 14. Medicamentos comercializados no Brasil selecionados para a pesquisa contendo antiinflamatórios não esteróides	52
TABELA 15. Sumário da resolução enantiomérica do ibuprofeno por CLAE-FEQ	59
TABELA 16. Sumário da resolução enantiomérica do flurbiprofeno por CLAE-FEQ ...	60
TABELA 17. Recomendações para a validação de métodos analíticos classificados de acordo com a Farmacopéia Americana 24 ed.	63
TABELA 18. Características importantes de validação de acordo com a ICH (International Conference on Harmonization) para vários tipos de ensaios analíticos	64
TABELA 19. Amostras comerciais do atenolol, do metoprolol e do flurbiprofeno selecionadas para aplicação dos métodos padronizados	71
TABELA 20. Esquema para a obtenção das soluções para o teste de recuperação	84

TABELA 21. Distribuição dos volumes das soluções das amostras e da solução padrão para realização do teste de recuperação	92
TABELA 22. Preparação das diluições de solução contendo 40,00µg/mL de S-flurbiprofeno (S-FLU) para obtenção da curva de calibração	95
TABELA 23. Distribuição dos volumes das soluções das amostras e da solução padrão para realização do teste de recuperação	98
TABELA 24. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do metoprolol	105
TABELA 25. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do atenolol	111
TABELA 26. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do pindolol	117
TABELA 27. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do betaxolol	123
TABELA 28. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do nadolol	125
TABELA 29. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do ibuprofeno	130
TABELA 30. Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do flurbiprofeno	148
TABELA 31. Parâmetros obtidos que comprovam a eficiência do método proposto	167
TABELA 32. Dados representando a precisão do método proposto para a análise das amostras A, B, C e D	168
TABELA 33. Proporções de R-atenolol e de S-atenolol presentes nas amostras comerciais A, B, C e D	169
TABELA 34. Resultados do teste de recuperação da solução padrão do (R)-enantiômero do atenolol adicionada às amostras A, B, C e D e analisadas pelo método proposto	170
TABELA 35. Resultados do teste de recuperação da solução padrão do (S)-enantiômero do atenolol adicionada às amostras A, B, C e D e analisadas pelo método proposto	171
TABELA 36. Parâmetros obtidos que comprovam a eficiência do método proposto ...	175
TABELA 37. Dados representando a precisão do método proposto para análise dos enantiômeros do metoprolol na amostra comercial E	176
TABELA 38. Proporções de R-metoprolol e S-metoprolol presentes na amostra comercial E	177
TABELA 39. Resultados do teste de recuperação da solução padrão do (R)-enantiômero do metoprolol adicionada à amostra e, analisadas pelo método proposto	178

TABELA 40. Resultados do teste de recuperação da solução padrão do (S)-enantiômero do metoprolol adicionada à amostra e, analisadas pelo método proposto	178
TABELA 41. Parâmetros obtidos que comprovam a eficiência do método proposto ...	181
TABELA 42. Dados representando a precisão do método proposto para análise dos enantiômeros do flurbiprofeno na amostra comercial F	182
TABELA 43. Proporções de R-flurbiprofeno e S-flurbiprofeno presentes na amostra comercial F	183
TABELA 44. Resultados do teste de recuperação da solução padrão do (R)-enantiômero do flurbiprofeno adicionada à amostra F, analisada pelo método proposto	184
TABELA 45. Resultados do teste de recuperação da solução padrão do (S)-enantiômero do flurbiprofeno adicionada à amostra F, analisada pelo método proposto	184

RESUMO

A maioria dos agentes terapêuticos, freqüentemente prescritos, são formulados e comercializados sob a forma racêmica, embora para alguns deles, já tenha sido demonstrado que os efeitos farmacológicos e/ou tóxicos estejam relacionados apenas a um dos enantiômeros. Além disso, é conhecido o fato de que os enantiômeros podem apresentar perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos diferentes. Neste trabalho foram selecionados fármacos que fazem parte de dois grupos importantes no uso clínico. São fármacos freqüentemente prescritos, como os β -bloqueadores (atenolol, metoprolol, pindolol, betaxolol e nadolol) e os antiinflamatórios não-esteróides (ibuprofeno e flurbiprofeno).

Existem na literatura científica várias citações que descrevem o uso da cromatografia líquida de alta eficiência com fases estacionárias quirais (CLAE-FEQ) em estudos farmacológicos, mas não na análise quantitativa dos enantiômeros em preparações farmacêuticas. É conhecido o fato de que o método CLAE-FEQs oferece vantagens sobre as técnicas clássicas de separação e análise de estereoisômeros, especialmente para os enantiômeros.

As separações enantioméricas diretas do atenolol, metoprolol, nadolol e betaxolol foram obtidas utilizando-se FEQ Chiralcel OD[®]. Os enantiômeros do pindolol foram separados com FEQ α -Burke 2[®] e os do ibuprofeno e do flurbiprofeno com FEQ do tipo Whelk-O 1[®]. Neste trabalho são apresentados métodos rápidos e sensíveis para determinação estereoespecífica do atenolol (AT), do metoprolol (MT) e do flurbiprofeno (FLU) em formulações farmacêuticas.

A determinação quantitativa dos enantiômeros do atenolol e do metoprolol nos comprimidos foi realizada através de método cromatográfico validado. As condições analíticas foram padronizadas através do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, usando coluna do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil, Chiralcel OD[®], (250x4.6 mm, 10 μ m) como FEQ. As amostras foram cromatografadas à temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 μ L. A detecção foi efetuada em 276 nm.

Para o atenolol a fase móvel foi constituída de hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v), com vazão de 1,0 mL/min. As curvas padrões do R-AT e do S-AT apresentaram boa linearidade entre 50,0-130,0 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9991 e 0,9980 respectivamente. As amostras comerciais A, B, C e D referentes a R-AT analisadas, apresentaram coeficiente de variação e percentual de recuperação de 1,15% e 101,06%; 0,74% e 99,25%; 1,05% e 102,57%; 0,84% e 101,57% respectivamente, já o coeficiente de variação e percentual de recuperação do S-AT nas amostras A, B, C e D foram 1,33% e 98,87%; 0,99% e 100,76%; 1,17% e 101,69%; 1,26% e 100,39%, respectivamente.

Para o metoprolol a fase móvel foi constituída de hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v), com vazão de 0,8 mL/min. As curvas padrões do R-MT e do S-MT apresentaram boa linearidade entre 30,0-110,0 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9988 e 0,9990 respectivamente. A amostra comercial analisada, apresentou coeficiente de variação e percentual de recuperação de 0,86% e 98,62% para R-MT e de 1,40% e 99,39% para S-MT.

Um método cromatográfico foi desenvolvido e validado para separação e quantificação enantiomérica do FLU na forma farmacêutica. As condições analíticas foram padronizadas através do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, usando coluna do tipo Whelk-O 1[®] (250x4,6 mm, 5,0 µm) como FEQ. As amostras foram cromatografadas à temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 µL. A detecção foi efetuada em 246 nm. A fase móvel foi constituída de hexano:etanol:ácido acético (95:05:0,2 v/v/v), com vazão de 0,9 mL/min. A curva padrão do S-FLU apresentou boa linearidade entre 2,0-18,0 µg/mL, com coeficiente de correlação de 0,9993. A amostra comercial analisada apresentou coeficiente de variação e percentual de recuperação de 0,16% e 100,1% para R_FLU e 0,14% e 100,4% para S-FLU, respectivamente.

Os métodos propostos permitam a separação quantitativa dos enantiômeros de AT, MT e FLU contidos nas formas farmacêuticas analisadas, com precisão e exatidão e que podem ser aplicados no controle de qualidade enantiomérico destes fármacos.

SUMMARY

The majority of the therapeutic agents, frequently prescribed, are formulated and commercialized as racemic mixture, even so for some of them, it has been demonstrated that the pharmacological and/or toxic effect are confined only to one of the enantiomer. Besides, it is well known that the enantiomers can present different pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. In the present work we selected drugs belonging to two classes of clinical importance. These pharmaceuticals are widely prescribed in clinical practice such as, the beta-blockers (atenolol, metoprolol, pindolol, betaxolol and nadolol) and the non-steroid anti-inflammatory drugs (ibuprofen and flurbiprofen).

Several references could be found in scientific literature that describes the use of high performance liquid chromatography with chiral stationary phase (HPLC-CSP) in pharmacological studies, seldom in the quantitative determination of enantiomers in pharmaceutical formulations. It is well known that the HPLC-CSP methods offer distinct advantages over classical techniques of isomeric separation and analysis, especially for the enantiomeric separation.

The direct enantiomeric separation of atenolol, metoprolol, nadolol and betaxolol were obtained using CSP Chiralcel OD[®]. The enantiomers of pindolol were separate utilizing CSP α -Burke 2[®] and those of ibuprofen and the flurbiprofen with CSP Whelk-O 1[®]. In this work are presented efficient and sensitive methods for stereospecific determination of atenolol (AT), metoprolol (MT) and flurbiprofen (FLU) in pharmaceutical formulations.

The stereoselective determination of atenolol and metoprolol in pharmaceuticals was performed through validated chromatographic method. The validation of liquid chromatographic methods was done utilizing a cellulose tris- 3,5-dimethylphenyl carbamate, Chiralcel OD[®], (250x4.6 mm, 10 μ m) as CSP. The samples were analyzed at room temperature with injection volume of 20 μ L and UV detection was made at 276nm.

In case of atenolol, the mobile phase was constituted of hexane:ethanol:diethylamine:acetic acid (60:40:0.2:0.2 v/v), with a flow rate of 1.0 mL/min. Separate standard curve for R-AT and S-AT showed good linearity over a concentration range from 50-130 µg/mL, with coefficient of correlation of 0.9991 and 0.998, respectively. The coefficient of variation and average recovery for R-AT in the samples A, B, C, and D were 1.15% and 101.06%; 0.74% and 99.25%; 1.05% and 102.57%; 0.84% and 101.57% respectively. The coefficient of variation and average recovery for S-AT in samples A, B, C and D were 1.33% and 98.87%; 0.99% and 100.76%; 1.17% and 101.69%; 1.26% and 100.39%, respectively.

In case of metoprolol, the mobile phase was constituted of hexane:ethanol:diethylamine:acetic acid (40:60:0.2:0.2 v/v), with a flow rate of 0.8 mL/min. Separate standard curve for R-MT and S-MT showed good linearity over a concentration range from 30-110 µg/mL, with coefficient of correlation of 0.9988 and 0.9990, respectively. The coefficient of variation and average recovery for R-MT in sample analyzed was 0.86% and 98.62% and for S-MT was 1.40% and 99.39%, respectively.

A high performance liquid chromatographic method is developed and validated for enantiomeric separation and quantitative determination of FLU in pharmaceutical preparation. A Whelk-O 1[®] column (250x4.6 mm, 5µm) was used as chiral stationary phase (CSP). The mobile phase was constituted of hexane:ethanol:acetic acid (95:05:0.2 v/v/v), at a flow rate of 0.9 mL/min and UV detection at 246nm. All experiments were done at ambient temperature. The S-FLU standard curve showed linearity over a concentration range from 2-18µg/mL, ($R^2 = 0.9993$). The coefficient of variation and average recovery of R-FLU were 0.16% and 100.13% and for S-FLU were 0.14% and 100.4%; respectively.

The proposed methods permits quantitative separation of AT, MT and FLU enantiomers in pharmaceutical formulations studied with precision and accuracy. The proposed validated methods can be used in the enantiomeric quality control of referred pharmaceutical drugs.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos opticamente ativos têm sido muito estudados atualmente. Substâncias como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos apresentam quiralidade, propriedade essa que está diretamente ligada à ação farmacológica destes compostos. Devido à quiralidade, os seres vivos, normalmente, mostram respostas biológicas diferentes a um ou a outro par dos enantiômeros. Assim por exemplo o L(+)-glutamato de sódio tem sabor agradável, enquanto que o D(-) é amargo.

É de grande importância analítica a determinação de compostos estereoisoméricos dos fármacos e seu reconhecimento individual, pois, por exemplo, o dextrometorfeno é antitussígeno, enquanto que o levometorfeno, seu estereoisômero, é narcótico com venda controlada. Já é bem documentado o fato de que a atividade teratogênica da talidomida, observada na década de sessenta, é devida, exclusivamente, ao enantiômero (S). Os dois enantiômeros já foram separados, quantificados e estão sendo reconhecidos como dois produtos químicos diferentes.

Devido ao reconhecimento da importância do emprego de fármacos isomericamente puros e as vantagens oferecidas pelo seu uso clínico no tratamento de diversas doenças, as indústrias farmacêuticas, as indústrias químicas e grupos de pesquisadores da área, desenvolveram técnicas novas para produzir isômeros na forma isolada, em quantidades industriais ^(73, 144).

A quiralidade dos compostos químicos, especialmente compostos terapêuticos é um tema muito importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e órgãos fiscais de controle de qualidade de medicamentos. Para garantir a segurança e a eficiência dos fármacos disponíveis e em desenvolvimento, é necessário isolar e examinar cada um dos enantiômeros separadamente. Além disso, é importante também o controle da composição estereoquímica desde a síntese até o consumo, envolvendo estudos farmacológicos, fabricação e controle de qualidade⁽¹⁷⁸⁾.

Durante muitos anos, o isomerismo óptico foi ignorado nos campos farmacêutico e bioquímico por não existir um método de separação e de quantificação eficiente e confiável para a determinação da pureza enantiomérica. A separação de enantiômeros por cromatografia gasosa e/ou cromatografia líquida de alta eficiência começou a ser aplicada com êxito desde os anos sessenta. Nos anos setenta, com o aparecimento das colunas de pequenas partículas para cromatografia líquida, começou realmente o desenvolvimento das fases estacionárias quirais para isolamento eficiente dos isômeros nas misturas racêmicas de fármacos.

As técnicas cromatográficas empregando fases estacionárias quirais são de grande valor na análise de fármacos e compostos químicos quirais. A técnica permite identificação, quantificação e separação de um grande número de misturas racêmicas de princípio (s) ativo (s), em várias matrizes como, amostras biológicas, intermediários de sínteses assimétricas e principalmente no controle de qualidade dos fármacos quirais comercializados como misturas racêmicas ou na forma de enantiômeros isolados. Devido a essas características, estudos envolvendo a aplicação das técnicas cromatográficas na análise de fármacos tem crescido nas últimas décadas^(2, 7, 13, 16, 32, 34, 68, 82, 87, 91, 92, 128, 131, 139, 146, 160, 165, 170, 182, 198, 199, 206, 208, 222).

Em anos recentes, foi verificado, desenvolvimento significativo, o que permitiu a resolução cromatográfica de enantiômeros. Basicamente são dois os caminhos para separação dos enantiômeros utilizando cromatografia líquida. Na metodologia indireta, os enantiômeros podem ser transformados no composto diastereoisomérico covalente pela reação com um reagente quiral e estes diastereoisômeros (com propriedades físico-químicas diferentes) são separados tipicamente utilizando fase estacionária não quiral de rotina.

No método direto, os enantiômeros ou seus derivados são injetados na coluna contendo fase estacionária quiral, ou então utiliza-se um solvente quiral, ou mais comumente, uma fase móvel contendo aditivos quirais.

Outras metodologias analíticas empregadas para separação, identificação e quantificação de enantiômeros incluem a eletroforese capilar (EC), a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia em papel e a cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia com fluidos super (CFS) e sub-críticos^(4, 10, 19, 20, 59, 78, 88, 180, 200, 216, 217). A Figura 1 apresenta o esquema de desenvolvimento das técnicas cromatográficas e eletroforéticas, nas últimas quatro décadas, empregadas para separação enantiomérica de compostos químicos. Desde a década de 70 o uso de CLAE na separação enantiomérica de compostos quirais tem sido empregado com constante evolução⁽¹⁷⁶⁾.

FIGURA 1 Desenvolvimento dos métodos cromatográficos e eletroforéticos para separação enantiomérica de compostos químicos⁽⁹⁾.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é considerada uma das técnicas mais eficientes para separação, detecção e quantificação de compostos químicos e biológicos. Desta maneira, a separação dos enantiômeros por CLAE é possível, desde que se empregue uma fase estacionária quiral (FEQ) adequada e eficiente.

Na maioria dos casos em que se emprega a CLAE é necessário o estudo de várias condições para a escolha de um sistema de fases móveis e de outras variáveis do método. Entretanto, a seleção da técnica e do método escolhido baseia-se no objetivo do seu uso, como por exemplo, para estudos farmacocinéticos, ou para controle de qualidade enantiomérico de fármacos ^(74, 197).

Para que um método analítico seja empregado com segurança na análise de fármacos quirais, é necessária a validação visando a comprovação de precisão, exatidão e a conseqüente aplicabilidade na separação e quantificação, especialmente no controle da qualidade enantiomérica ^(11, 23, 25, 35, 74, 100, 101, 105, 106, 126, 172, 182, 194, 204).

A Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾ define validação de um método analítico como um processo comprovado por meio de estudos laboratoriais, através do qual são estabelecidas as características para o uso requerido em uma análise específica. Vários órgãos reguladores, como, Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾, a “International Conference on Harmonization” ^(100, 101) e a “Association of Official Analytical Chemists International” ⁽¹¹⁾ fornecem orientações sobre o procedimento para o processo de validação de métodos analíticos.

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que tal método é adequado para a aplicação analítica devida. A documentação completa da validação de um método analítico é parte integral de qualquer processo submetido aos órgãos reguladores. O desenvolvimento de novos fármacos quirais implica na quantificação e validação de ensaios analíticos permitindo a determinação da composição enantiomérica de cada fármaco. O enantiômero não desejado é considerado como impureza e deve ser quantificado. Neste contexto, o desenvolvimento de ensaios enantiosseletivos específicos é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos quirais ^(11, 100, 101, 178, 204).

Entretanto, é preciso que sejam desenvolvidos métodos rápidos e eficientes para acompanhar ritmo de desenvolvimento e produção de isômeros puros e conseqüentemente o fármaco esteja disponível no mercado para uso clínico e terapêutico. O lançamento de um medicamento pode ser comercializado somente após disponibilidade de um método analítico adequado assim garantindo o controle total de sua qualidade ⁽¹⁸²⁾.

A finalidade desta pesquisa é o desenvolvimento de métodos de separação enantiomérica empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fases estacionárias quirais para a determinação quantitativa de enantiômeros visando a aplicação no controle de qualidade de preparações farmacêuticas disponíveis comercialmente no Brasil, sob a forma racêmica ou como enantiômeros isolados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM FASE QUIRAL (CLAE-FQ)

2.1.1 MÉTODO DE SEPARAÇÃO E MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS SEPARAÇÕES ENANTIOMÉRICAS

A separação cromatográfica de enantiômeros pode ser alcançada por vários métodos, todavia, é sempre necessário o uso de algum tipo de discriminador ou seletor quiral ^(48, 209). Dois tipos diferentes de seletores podem ser descritos : o emprego de uma fase estacionária quiral ou de um aditivo quiral na fase móvel. Outra possibilidade é a derivatização pré-coluna das amostras com reagentes quirais para obtenção de moléculas diastereoméricas, as quais podem ser separadas pelo método não quiral de cromatografia.

O mecanismo de separação depende do método empregado. No entanto, deve-se reconhecer que o mecanismo da separação quiral, algumas vezes, ainda não é bem entendido. Os vários caminhos utilizados para separação enantiomérica estão descritos a seguir:

2.1.1.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE DIASTEREISÔMEROS

Essa é a técnica mais antiga e foi amplamente utilizada na cromatografia para resolução enantiomérica ⁽¹⁵⁾. A derivatização pré-coluna de uma substância opticamente ativa com outra molécula também opticamente ativa, depende da habilidade de derivatização da molécula alvo. Grande número de grupos funcionais e derivados foram investigados, entre eles, grupos amino (derivados de amido, carbamatos, uréia, tiouréia e sulfamidos), grupos hidroxila (ésteres, carbonatos e carbamatos), grupos carboxílico (ésteres e amidos), epóxidos (isotiocianato), olefinas (complexo platina quiral) e tiois (tioésteres).

Esta metodologia foi largamente utilizada com grande variedade de colunas (fase normal e fase reversa) e fases móveis e apresenta vantagens e limitações no emprego. Entre as vantagens estão:

- a) facilidade de aplicação e acesso mais fácil,
- b) utilização dos acessórios padrão da CLAE e fases móveis facilmente disponíveis,
- c) detecção do soluto com baixa absorção em ultravioleta. Um agente de derivatização com forte grupo cromóforo ou fluoróforo pode ser utilizado para aumentar a sensibilidade.

Entre as limitações pode-se destacar:

- a) necessidade do isolamento do composto de interesse e sua derivatização. Este fato dificulta o desenvolvimento do processo automatizado para grande número de amostras,
- b) a contaminação enantiomérica dos agentes derivatizantes pode dar origem a resultados falsos, assim limitando a análise rotineira.

Ex. Cloreto de (-)-N-trifluoracetil-1-prolila (TPC) na determinação da composição enantiomérica do propranolol em amostras biológicas,

- O (-) TPC vem contaminado com 4-15% de enantiômero (+)
- O (-) TPC racemiza-se rapidamente durante o armazenamento ⁽¹⁸¹⁾.

c) diferentes velocidades de reação e/ou constantes de reação, quando reagem com outras moléculas quirais, originando dois produtos diastereoisoméricos em proporção diferente da composição enantiomérica inicial ⁽¹¹⁸⁾.

2.1.1.2 RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA COM UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS QUIRAIS NA FASE MÓVEL

A utilização de aditivos quirais nos eluentes da CLAE representa uma nova contribuição no campo da CLAE moderna. A resolução dos compostos enantioméricos foi realizada pela formação dos complexos diastereoisoméricos com um composto quiral adicionado à fase móvel. A resolução quiral é resultado da diferença de estabilidade dos complexos diastereoisoméricos na solvatação da fase móvel ou na ligação dos complexos ao suporte sólido ⁽¹²⁵⁾.

Existem alguns fatores que devem ser considerados na escolha do tipo de aditivo quiral na fase móvel. Assim é importante que:

- i) a fase móvel seja simples e sua manipulação seja fácil, permitindo diferentes modificações;
- ii) sejam evitados reagentes instáveis e de difícil obtenção e preparação;
- iii) o reagente quiral forme diastereoisômeros estáveis com solutos de enantiômeros;
- iv) os solutos enantioméricos possam ser removidos sem derivatização;
- v) possam ser utilizadas colunas de uso frequentes (Ex. C8 ou C18) e disponíveis comercialmente;
- vi) as impurezas não enantioméricas possam ser determinadas.

A adição de aditivos pode tornar a fase móvel mais complexa, o que constitui uma limitação do método, principalmente quando se visa a aplicação em escala preparativa. Outra limitação do método é a escolha do detector, que deve ser altamente sensível e específico.

São pelo menos três os caminhos principais que resultam na formação dos complexos diastereoisoméricos ou seja, complexos transitórios com metais iônicos (troca de ligantes), pares iônicos e complexos de inclusão. Todos estão baseados na formação de complexos reversíveis.

2.1.1.2.1 TROCA DE LIGANTES

A cromatografia quiral de troca de ligantes é baseada na formação de complexos diastereoisoméricos envolvendo um íon metálico transitório (M), o enantiômero individual da molécula quiral (L) e o soluto racêmico (*d* e *l*).

Os complexos mistos diastereoisoméricos de quelatos produzidos neste sistema podem ser representados pelas fórmulas : L-M-*d* e L-M-*l*. O íon metálico transitório mais utilizado nesta separação é Cu^{2+} e o ligante seletor é normalmente o aminoácido L-prolina. A separação cromatográfica, normalmente, é efetuada utilizando-se uma coluna não quiral como na CLAE tradicional, com os aditivos quirais adicionados à fase móvel⁽¹²⁴⁾. Entre as vantagens decorrentes do emprego deste método estão:

- a) a fase móvel empregada é aquosa (mais econômica),
- b) o íon metálico e o seletor ligante podem ser adicionados como modificadores na fase móvel;
- c) o seletor ligante pode ser ligado à fase estacionária,
- d) é uma técnica excelente para separação enantiomérica de aminoácidos e compostos com estruturas semelhantes,
- e) no caso de aminoácidos e compostos semelhantes, normalmente não há necessidade de pré-derivatização.

Entre as desvantagens estão:

- a) poucos tipos de compostos podem ser resolvidos com esta técnica (falta de diversidade),
- b) várias moléculas catiônicas e aniônicas de interesse farmacêutico não foram separadas,
- c) somente as moléculas capazes de formar complexos com íon metálico podem ser separadas por este método.

2.1.1.2.2 PAR IÔNICO

A cromatografia de par iônico é uma técnica cromatográfica líquida na qual, normalmente são utilizados solutos carregados. O método é baseado na formação de “complexos neutros” (SC) entre soluto carregado, (S^+) e seu contra-íon de carga oposta, (C^-). Quando ambos, isto é, o soluto e o contra-íon, são opticamente ativos, forma-se um par iônico diastereoisomérico. Este par iônico pode ser separado pela diferença de solvatação na fase móvel ou na ligação com a fase estacionária.

Compostos como aminoálcoois (alprenolol), ácidos carboxílicos (ácido trópico e naproxeno), aminoácidos (triptofano) ⁽¹⁶¹⁾ são alguns exemplos de compostos separados por este método, que, apesar das vantagens, pode apresentar as seguintes desvantagens:

- a) o sistema de par iônico quiral não é estável,
- b) o sistema cromatográfico pode ser alterado pelo conteúdo de água na fase móvel, temperatura, pH e outros fatores,
- c) é difícil padronizar a aplicação de rotina,
- d) os contra-íons apresentam absorção na região do UV, reduzindo assim a sensibilidade do sistema. Sendo necessário a utilização simultânea de outro detector.

2.1.1.2.3 INCLUSÃO (CAVIDADE)

O uso da coluna do tipo cavidade ou inclusão é baseado no fato de que as moléculas podem encaixar-se nas cavidades formadas. Além disso, pode ocorrer interação da ligação hidrogênio, especialmente em colunas constituídas à base de carboidratos ^(123, 164, 195, 209). As amostras separadas por coluna do tipo cavidade, ou não possuem grupos funcionais polares ou apresentam somente um e são de tamanho quase igual ao da cavidade. As colunas de polímeros são úteis quando se trata da análise de amostras com funcionalidades polares limitadas.

A formação de complexos de inclusão depende da forma, do tamanho e da geometria espacial do soluto, assim como do diâmetro da cavidade da β -ciclodextrina ^(88, 215). Durante o processo de reconhecimento quiral, são envolvidos diferentes tipos de ligações não-covalentes para a formação da complexação entre o soluto e as moléculas de ciclodextrina, como também entre as moléculas do modificador orgânico e a cavidade da ciclodextrina. Entre as forças envolvidas podem ser citadas: interação eletrostática, interação π - π , pontes de hidrogênio, forças de “Van der Waals” ou interação dipolo-dipolo e interação hidrofóbica ^(88, 164, 215).

FIGURA 2. Projeções computadorizadas da estrutura dos complexos de inclusão, a) d-propranolol e b) l-propranolol em β -ciclodextrinas resultantes da cristalografia de raio X. As linhas pontilhadas representam as ligações potenciais de hidrogênio ⁽²¹⁵⁾.

O método apresenta algumas limitações, pois, vários compostos da mesma classe não podem ser resolvidos. Por exemplo, o hexobarbital e o metilfenobarbital são resolvidos, no entanto, o secobarbital e o pentobarbital, não foram resolvidos quando β -ciclodextrina foi adicionada na fase móvel.

2.1.1.3 RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA COM UTILIZAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS (COLUNAS QUIRAIS)

Entre os métodos analíticos mais empregados para a separação, identificação e quantificação de enantiômeros está a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral (CLAE-FEQ) ^(4, 10, 59, 78, 88, 91, 92, 93, 149, 150, 151, 152, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 176, 216, 217, 220, 221). A técnica tem sido amplamente aplicada na determinação da pureza óptica e da constituição isomérica de medicamentos, matérias-primas, preparações farmacêuticas e fluídos biológicos ^(14, 28, 37, 61, 71, 90, 117, 119, 121, 140, 174, 190, 193), estudos de instabilidade configuracional de fármacos (racemização, enantiomerização, epimerização) ^(60, 62, 70, 102) e determinação da farmacocinética e metabolismo de fármacos ^(29, 58, 163, 222).

Os enantiômeros podem ser resolvidos pela formação de complexos diastereoisoméricos entre o soluto (transitando pela coluna) e as moléculas quirais, as quais estão ligadas à fase estacionária (impregnadas no interior da coluna). A fase estacionária é conhecida como fase estacionária quiral (FEQs) e seu uso tem crescido rapidamente na área da separação quiral.

A primeira FEQ para CLAE tornou-se disponível comercialmente em consequência dos trabalhos de PIRKLE e colaboradores ⁽¹⁶⁶⁾. No momento, dezenas de fases estacionárias quirais estão disponíveis no comércio através de diferentes fornecedores.

Atualmente, existem várias teorias sobre o mecanismo da separação envolvendo discriminação ou reconhecimento enantiomérico pela fase estacionária quiral. A estereoquímica e o mecanismo envolvidos com cada uma das fases estacionárias quirais, empregadas neste trabalho serão discutidos separadamente mais adiante. O conceito mais aceito pelos pesquisadores de área envolve a teoria de três pontos de ligação.

Segundo esta teoria são necessários, pelo menos, três pontos de ligação (ou interações) entre a molécula quiral e a fase estacionária quiral para que ocorra a resolução dos enantiômeros. Uma destas interações deve ser estereoespecífica. A presença de π ácidos, π bases, doadores e/ou receptores de ligação de hidrogênio e outros grupos funcionais ligados ao seletor quiral da FEQ fornecem os três pontos de interação requeridos. Outros pontos adicionais que proporcionam interações atrativas e/ou repulsivas, também contribuem para a enantiosseletividade ^(12, 50, 167).

A Figura 3 mostra um exemplo da FEQ derivada da L-arginina, explicando a separação dos enantiômeros da DOPA (diidroxifenilalanina). Foram propostas duas interações iônicas e uma interação dipolar entre a FEQ (B) e o enantiômero mais retido da DOPA (A) ⁽¹²⁾.

FIGURA 3. Interações em três pontos propostas por BACZUK e colaboradores para explicar a separação dos enantiômeros da DOPA (diidroxifenilalanina) (a), em uma FEQ derivada da L-arginina (b) ⁽¹²⁾.

Recentemente, MESECAR e colaboradores ⁽¹³⁸⁾ propuseram em artigo publicado na revista “NATURE”, um modelo diferente, baseado na teoria de quatro pontos de ligações, entre, o discriminador quiral e o soluto isomérico, para que ocorra o reconhecimento quiral. Os autores chamaram o modelo de “Four-Location Model”, embora não sejam necessários quatro pontos de interação simultâneos, para que ocorra o reconhecimento quiral. Para tanto, foi empregado o modelo de quimiotripsina com o substrato, L-aminoácido e como inibidor, o D-aminoácido.

Separação enantiomérica de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida com fase estacionária quiral
Anil Kumar Singh – Tese para obtenção do grau de DOUTOR FCF/USP 2002

FIGURA 5. Etapas envolvidas no processo de reconhecimento quiral ⁽²²⁾

A estrutura cristalina determinada para o racemato do mandelato indica que esta proteína também se enquadra no "modelo de quatro pontos". A Figura 4, explica como o antípoda (com orientação de molécula oposta) apresenta as quatro ligações aproximando-se pela direção oposta, ou seja, podem ocorrer além das três ligações clássicas A-A', B-B', e/ou C-C', a quarta ligação D-D' ou D-D''⁽¹³⁸⁾.

FIGURA 4. Teoria de quatro pontos de ligação (reconhecimento estereoespecífico)⁽¹³⁸⁾.

Por outro lado, BOOTH e colaboradores⁽²²⁾ descreveram o processo de reconhecimento quiral, como um processo complexo envolvendo várias etapas. O processo esquemático está apresentado na Figura 5.

FIGURA 5. Etapas envolvidas no processo de reconhecimento quiral⁽²²⁾

2.1.1.3.1 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO PIRKLE

Cerca de uma dúzia de diferentes colunas deste tipo estão disponíveis no comércio. As fases estacionárias quirais do tipo Pirkle podem ser utilizadas tanto em fase normal quanto em fase reversa proporcionando assim, grande vantagem sobre as colunas derivadas de celulose e amilose. Na maioria dos casos, a separação pode ser melhorada utilizando-se a técnica de derivatização. A estereoquímica da fase estacionária quiral é conhecida, assim a ordem de eluição pode ser determinada previamente e alterada se for necessário ^(4, 110, 165, 166, 169, 220). Pequenas modificações nas fases móveis podem alterar em grandes proporções a seletividade da coluna ⁽¹⁴⁸⁾.

2.1.1.3.1 (a) α -BURKE-2[®]

A separação enantiomérica com esta coluna pode ser realizada em fase normal, empregando-se propanol-hexano como fase móvel, ou em fase reversa, com metanol-água. Modificações na concentração do álcool são utilizadas para determinar o fator k' e melhorar a separação. Na maioria dos casos, a separação pode ser melhorada utilizando-se a técnica de derivatização. Pequenas modificações na fase quiral podem influenciar e modificar a seletividade da coluna ^(170, 184).

A fase estacionária quiral α -BURKE-2[®] é resultado de um trabalho de pesquisa realizado no laboratório do Prof. William H. Pirkle ⁽¹⁶⁵⁾. Esta fase é derivada de fosfonato de dimetil N-3, 5-dinitrobenzoil- α -amino-2, 2-dimetil-4-pentenil ligada a partículas de sílica (5 μ m) por ligações covalentes. A estrutura da fase estacionária quiral (S, S)- α -BURKE-2[®] está apresentada na Figura 6. A referida fase estacionária é do tipo π -acceptor especialmente desenvolvida para a separação enantiomérica dos álcoois amínicos, como os β -bloqueadores. O mecanismo envolvido no reconhecimento e nas separações por esta FEQ está representado na Figura 7. Posteriormente, esta fase estacionária quiral foi empregada, com sucesso, para a separação de compostos que já haviam sido separados com colunas do tipo Pirkle π -acceptor ^(110, 160, 165, 169).

FIGURA 6. Estrutura da fase estacionária quiral (S, S) α -Burke-2[®] (38, 165)

FIGURA 7. Representação esquemática do reconhecimento quiral com a FEQ do tipo π -receptor (167, 169).

Esta fase estacionária é de extrema eficiência em relação à resolução e seletividade na separação do pindolol. Com uma fase móvel constituída por acetonitrila, etanol e acetato de amônio, o fator de capacidade do primeiro pico (k_1) diminui enquanto o fator de capacidade do segundo pico (k_2) aumenta com decréscimo da temperatura da coluna, sem considerável alargamento dos picos (38).

2.1.1.3.1 (b) WHELK-O I[®]

As fases estacionárias quirais do tipo Pirkle, derivadas de dinitrobenzoil, podem ser utilizadas em fase normal, empregando-se propanol-hexano como fase móvel e em fase reversa, com metanol-água^(170, 184).

PIRKLE e McCUNE⁽¹⁶⁷⁾, PIRKLE e POCHAPSCKY⁽¹⁶⁸⁾ e WELCH, SZCZERBA e PERRIN⁽²²¹⁾, propuseram um modelo de reconhecimento quiral baseado nas interações π - π , dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio e efeitos estéricos (Figura 7 e Figura 9). Em geral, a separação analítica nessas FEQs é devida à presença de grupos funcionais aromáticos. A importância do grupo aromático para o sucesso da separação é a natureza da interação π -doador - π -aceptor entre as espécies aromáticas.

A estrutura da fase estacionária quiral (S, S)-Whelk-O I[®] está apresentada na Figura 8. Especificamente, as fases contêm ambos os grupos funcionais, π -ácidos (p-nitrobenzoil) e π -básicos (anel naftil) (Figura 9). Os três pontos de interação principais para reconhecimento quiral são (a) ponte de hidrogênio entre o grupo amido da FEQ e o grupo carboxílico do soluto; (b) interação π - π entre o conjunto dinitrobenzoil da FEQ e o anel naftil ou outro anel aromático do soluto; (c) interação π - π entre o conjunto tetraidrofenantreno da FEQ e o sistema aromático presente no soluto^(51, 110, 221).

FIGURA 8. Estrutura da fase estacionária quiral (R, R)-Whelk-O I[®] e (S, S)-Whelk-O I[®]
(38, 221)

FIGURA 9. Representação esquemática de três pontos de ligação envolvidos na separação enantiomérica dos enantiômeros dos antiinflamatórios não-esteróides com a FEQ do tipo (S, S)-Whelk-O 1[®] (38, 221).

TABELA 1. COLUNAS QUIRAIS DO TIPO “BRUSH” (TIPO PIRKLE) DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO ⁽³⁸⁾

Fabricante	Nome da FEQ *	Tipo de coluna	Discriminador quiral **
Baker	Bakerbond [®] Chiral Ionic DNBPG	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-fenilglicina
	Bakerbond [®] Chiral Covalent DNBPG	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-fenilglicina
	Bakerbond [®] Chiral Covalente DNBLeu	“Brush” π -acceptor	(S)-DNB-leucina
Regis	Ionic D-Phenyl Glycine	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-fenilglicina
	Covalent D-Phenyl Glycine	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-fenilglicina
	Covalent D-Phenyl Glycine	“Brush” π -acceptor	(S)-DNB-fenilglicina
	Covalent D,1-Phenyl Glycine	“Brush” π -acceptor	(R,S)-DNB-fenilglicina
	Ionic L-Leucine	“Brush” π -acceptor	(S)-DNB-leucina
	Covalent L-Leucine	“Brush” π -acceptor	(S)-DNB-leucina
	α -Burke-2 [®]	“Brush” π -acceptor	fosfonato de dimetil DNB- α -amino-2, 2-dimetil-4-pentenil
	Whelk-O 1 [®]	“Brush” π -acceptor- π -doador	DNB-tetraidrofenantreno
Serva	Chiral DNBPG-C=Si100Polyol	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-fenilglicina (covalente)
	Chiral DNBL-L-C=Si100Polyol	“Brush” π -acceptor	(S)-DNB-leucina
	Chiral DNBDL-C=Si100Polyol	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-leucina
	Chiral ProCu=Si100Polyol	Troca de ligantes	Prolina – cobre
	Chiral ValCu=Si100Polyol	Troca de ligantes	Valina – cobre
Sumitomo	Sumipax AO-1000 [®]	“Brush” π -doador	χ -Naftiletilamida
	Sumipax AO-2000 [®]	“Brush” π -acceptor	(R)-DNB-fenilglicina (iônica)
	Sumipax AO-3000 [®]	“Brush” tipo uréia	tert-Butilamocarbonil valina
	Sumipax AO-4000 [®]	“Brush” uréia π -doador	(S), (S)- χ -Naftiletilamocarbonil valina
Supelco	Supelcosil LC-(R)-Urea	“Brush” tipo uréia	Feniletiluréia

* As maiores das colunas do tipo “Brush” (Pirkle) são disponíveis nas formas (R, R) e (S, S).

** A maioria é ligada à sílica gel por meio de ligações covalentes

2.1.1.3.2 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO PROTEÍNA

Todas as proteínas possuem a habilidade de discriminar as moléculas quirais. No entanto, apenas um número limitado de proteínas foi explorado para preparação e utilização em colunas como fases estacionárias quirais. As FEQs com proteína apresentam vasta diversidade e enantiosseletividade ⁽⁶⁾. Uma série de FEQs derivadas de proteínas foi comercializada nas últimas duas décadas, entre elas as derivadas de albumina, entre elas a albumina sérica bovina (BSA) ⁽⁵⁾, a albumina sérica humana (HSA) ⁽⁵⁵⁾, a derivada de glicoproteínas, a α_1 -ácido glicoproteína (AGP) ⁽⁹¹⁾, a “Ovomucoid”, extraída de clara de ovo de galinha (OMCHI) ⁽¹⁴¹⁾ e a “Avidin” (AVI) ⁽¹⁴³⁾, derivada de enzimas, a celobioidrolase I (CBH I) ⁽⁶³⁾ e a pepsina ⁽⁸⁶⁾.

Entre as FEQs derivadas de proteínas a Resolvosil[®] e a Enantiopak[®] atingiram maior popularidade (Tabela 2). As colunas do tipo proteína parecem ser versáteis e são eficientes para diversos tipos de amostras. Geralmente, apresentam o valor de k' alto, porém, a extensão das bandas é larga. Em regra geral, as melhores separações são obtidas com fluxos menores. O efeito da fase móvel é importante na resolução. Cuidados com o carregamento da coluna devem ser observados, caso contrário, resultados falsos podem ser obtidos.

Entre as vantagens das fases derivadas de proteína estão, a possibilidade de serem empregadas com fases móveis aquosa a grande enantiosseletividade para considerável número de compostos, além de viabilidade de separação sem necessidade de derivatização. Todavia, podem ser constatadas algumas desvantagens, como baixa capacidade da FEQ, falta de rigidez da FEQ, faixa de pH da fase móvel limitada entre 3-8, emprego de suporte somente de sílica gel e conhecimento limitado do mecanismo envolvido nas separações ocorridas. Assim, muitas vezes com esta FEQ dois compostos de mesma classe e estrutura química similar podem apresentar enantiosseletividades diferentes ⁽⁸⁵⁾.

A coluna pode ser altamente influenciada pelo pH do meio. Assim em pH de 5-8 observa-se um efeito mínimo sobre k' e α , podendo haver modificações na forma ou na resolução da segunda banda. As tentativas de separação devem ser iniciadas em pH 6-7, que deve ser alterado somente se houver aumento da largura da segunda banda ou então aparecimento de cauda no pico ^(5, 179).

2.1.1.3.2.1 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ALBUMINAS

(a) Albumina sérica bovina

O primeiro trabalho empregando a albumina sérica bovina-agarose como a FEQ para separação enantiomérica de triptofano foi registrado há aproximadamente três décadas atrás. Em anos recentes várias FEQs derivadas de albumina sérica bovina foram desenvolvidas e utilizadas para separações enantioméricas de diversas classes de compostos como aminoácidos N-derivatizados, aminoácidos aromáticos, solutos neutros, sulfóxidos e derivados de sulfoximina ^(5, 6, 7). Normalmente a sílica gel, agarose e polímeros são utilizados para a imobilização de albumina sérica bovina ⁽⁸⁵⁾.

Essencialmente são três as variáveis de fases móveis que podem ser exploradas para otimizar a resolução de um determinado racemato entre elas, o pH, a força iônica e o modificador orgânico ⁽⁸⁾.

(b) Albumina sérica humana

DOMENICI e colaboradores ⁽⁵⁵⁾ pela primeira vez empregaram a fase estacionária quiral derivada da albumina sérica humana. Ácidos fracos e compostos neutros foram separados empregando-se esta FEQ. Entre eles destacam-se o derivados do ácido 2-arilpropionico, tais como, o naproxeno, o flurbiprofeno, o ibuprofeno, o citoprofeno e o fenoprofeno; os benzodiazepinos como o oxazepam, o lorazepam e o temazepam. As fases do tipo albumina sérica humana e a albumina sérica bovina são similares entre si com relação às ligações enantiosseletivas, podendo no entanto, ocasionar, algumas vezes, inversão na ordem de eluição dos isômeros ⁽⁵⁵⁾.

2.1.1.3.2.2 FASES ESTACIONÁRIAS QUITAIS DERIVADAS DE ALBUMINAS GLICOPROTEÍNAS

(a) α_1 -Ácido glicoproteína (AGP)

A AGP é constituída por uma única cadeia de peptídeo contendo 181 unidades de aminoácido e 5 unidades de heteropolissacarídeos contendo 14 resíduos de ácido siálico, mantendo assim o caráter ácido das proteínas. A FEQ com AGP foi desenvolvida por HERMANSSON e colaboradores ^(91, 93). Desde então inúmeros compostos químicos e farmacêuticos foram separados empregando-se esta coluna. Foram assim separados tanto compostos de natureza ácida e básica como neutra ^(91, 92, 93).

Quando se empregam colunas do tipo α_1 -Ácido glicoproteína vários fatores como pH da fase móvel, tipo e concentração do modificador orgânico, força iônica e temperatura influenciam o tempo de retenção e a seletividade dos isômeros. As propriedades de ligações de hidrogênio e propriedades hidrofóbicas dos modificadores orgânicos não carregador influenciam significativamente a enantioseletividade dos solutos ^(85, 92).

Poucas informações são disponíveis sobre os locais e mecanismo envolvido no reconhecimento quiral por AGP devido a falta de informações sobre a estrutura ternária dos complexos formados.

(b) Ovomucoid e ovoglicoproteína

MIWA e colaboradores desenvolveram a FEQs derivados de ovomucoid (OMCHI) e ovoglicoproteína (OVCHI) ^(141, 142). As colunas foram capazes de separar enantiômeros de compostos ácidos, básicos e neutros em matérias-primas e formulações farmacêuticas. KIRKLAND e colaboradores ⁽¹¹³⁾ relataram que coluna do tipo OMCHI apresenta estabilidade por maior tempo e maior número de injeções quando comparada com a FEQ do tipo AGP. Ainda a coluna OMCHI mostrou-se mais estável do que outras FEQs derivadas de proteínas.

Outro tipo de fase estacionária quiral derivada de albuminas glicoproteínas é a Avidin (AVI) e proteínas ligadas à riboflavina (RfBP). A avidin é uma glicoproteína básica derivada da clara de ovo e liga-se fortemente com a biotina. Foi utilizada para preparação de uma FEQ pela primeira vez por MIWA e colaboradores ⁽¹⁴²⁾.

2.1.1.3.2.3 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DERIVADAS DE ENZIMAS

(a) Tripsina e α -quimiotripsina

THEOLOHAN e colaboradores ⁽²⁰²⁾ e WAINER e colaboradores ⁽²¹²⁾ desenvolveram a FEQs derivadas de enzimas tais como, tripsina e α -quimiotripsina respectivamente. A coluna de tipo tripsina foi capaz de separar derivados de aminoácidos contendo elemento O e N. Com base nestes dados concluiu-se que o poder enantiosseletivo da tripsina reside na atividade enzimática ⁽²⁰²⁾.

A FEQ derivada de α -quimiotripsina foi capaz de separar os aminoácidos, derivados de aminoácidos e outros derivados do ácido ariloxipropiônico ⁽²¹²⁾.

(b) Celulase

A celulase mais popular e mais eficiente é celobioidrolase CBH 1. Com colunas contendo desta material foi possível a separação de compostos de diversas classes, assim como compostos básicos, ácidos e neutros. O destaque principal para esta FEQ é a separação enantiomérica de β -bloqueadores ^(63, 137).

(c) Lisozima

HAGINAKA e colaboradores ⁽⁸⁷⁾ desenvolveram uma FEQ contendo lisozima. Esta fase foi considerada eficiente para a separação enantiomérica de compostos básicos e compostos não carregados, quando a fase móvel era constituída de tampão fosfato e modificador orgânico. Entretanto, com esta FEQ não foi possível a separação de compostos de natureza ácida ⁽⁸⁷⁾.

(d) Pepsina

HAGINAKA e colaboradores ⁽⁸⁶⁾ desenvolveram a FEQ com pepsina. Compostos básicos e compostos não carregados foram separados empregando-se esta FEQ, por outro lado a FEQ não foi capaz de separar compostos de natureza ácida ⁽⁸⁶⁾.

(e) Amiloglicosidase

Recentemente, KARLSSON e colaboradores ⁽¹⁹¹⁾ desenvolveram a FEQ derivada de amiloglicosidase. A coluna desenvolvida foi considerada eficiente para a separação enantiomérica de β -bloqueadores. A enantiosseletividade e tempo de retenção podem ser controlados pela manipulação dos componentes da fase móvel, como o tipo e a concentração dos modificadores orgânicos, o pH, a força iônica da fase móvel e a temperatura da coluna ⁽¹⁹¹⁾.

TABELA 2. COLUNAS QUIRAIS DO TIPO PROTEÍNA DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO (4, 38, 85, 224)

Fabricante	Nome da FEQ	Tipo de coluna	Discriminador quiral
LKB	EnantioPac [®]	Afinidade	α_1 - Ácido glicoproteína
Nagel & Co.	Resolvosil BSA-7 [®]	Afinidade	Albumina sérica bovina
	BSA-7PX [®]	Afinidade	Albumina sérica bovina
Regis	Chiral AGP [®]	Afinidade	α_1 - Ácido glicoproteína
	Chiral CBH [®]	Afinidade	celobioidrolase I (Enzimas)
	Chiral HSA [®]	Afinidade	Albumina sérica humana
Shinwa Chemical Industries	ULTRON ES-BSA [®]	Afinidade	Albumina sérica bovina
	ULTRON ES-PEPSIN [®]	Afinidade	Pepsina (Enzima)
	ULTRON ES-OVM [®]	Afinidade	OMCHI “Ovomucoid” extraída de clara de ovo de galinha
Shandon	Chiral BSA [®]	Afinidade	Albumina sérica bovina
	Chiral HSA [®]	Afinidade	Albumina sérica humana
ChromTech AB	Chiral HSA [®]	Afinidade	Albumina sérica humana
	Chiral AGP [®]	Afinidade	α_1 - Ácido glicoproteína
	Chiral CBH [®]	Afinidade	celobioidrolase I (Enzimas)
GL Sciences	Bioptic AV-1 [®]	Afinidade	“Avidin” extraída de clara de ovo de galinha
Hewlett Packard	ULTRON ES-PEPSIN [®]	Afinidade	Pepsina (Enzima)
Zorbax [®]	ULTRON ES-OVM [®]	Afinidade	OMCHI “Ovomucoid” extraída de clara de ovo de galinha
	ULTRON ES-BSA [®]	Afinidade	Albumina sérica bovina

2.1.1.3.3 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO CAVIDADE OU INCLUSÃO

Na cromatografia líquida de alta eficiência empregando-se fases estacionárias quirais (FEQs), os enantiômeros podem ser resolvidos pela formação de complexos diastereoisoméricos entre o soluto e as moléculas quirais, as quais estão ligadas à fase estacionária. Seu uso tem crescido rapidamente na área da separação quiral.

A separação dos enantiômeros baseia-se na diferença de energia dos complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre os isômeros do soluto e a fase estacionária quiral (Figura 10). Quanto maior a diferença em energia, maior a separação cromatográfica. Quanto mais estável o complexo formado entre o enantiômero e a fase estacionária quiral, maior será o seu tempo de retenção na coluna quiral.

FIGURA 10. Representação esquemática da separação por diferença de energia dos complexos diastereoisoméricos transitórios (Adaptado com modificações) ⁽²¹¹⁾.

Nas maiorias das separações utilizando-se fases de polissacarídeos, a separação completa dos enantiômeros é atingida se a seletividade (α) for maior do que 1,2. Quando o valor de $\alpha=1,2$, a diferença em energia ($\Delta\Delta G=RT \ln\alpha$), entre a interação da FEQ e um par de enantiômeros é de somente 0,11 kcal/mol. Em outras palavras, uma separação completa pode ser atingida com diferença mínima de energia entre os complexos enantioméricos ⁽¹⁵⁰⁾.

2.1.1.3.3. (a) FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO CICLODEXTRINA (CHIRADEX®)

A ciclodextrina é um oligossacarídeo constituído por unidades de *d*- α -glicoses ligadas pela posição 1,4. As ciclodextrinas são produzidas pela degradação parcial do amido, cujas unidades de glicose são acopladas, por ação enzimática, produzindo estruturas cristalinas constituídas por moléculas de diferentes tamanhos que se agrupam sob a forma de cone. As três formas mais comuns desta molécula estão apresentadas na Tabela 3. ^(4, 184)

TABELA 3. PROPRIEDADES FÍSICAS DAS CICLODEXTRINAS (CD) ^(4, 184)

Tipo de CD	Unidade de Glicose	Peso molecular	Dimensões da cavidade (Å)		
			Diâmetro Ext.	Diâmetro Int.	Profundidade
α -CD	6	973	13,7	5,7	7,8
β -CD	7	1135	15,3	7,8	7,8
γ -CD	8	1297	16,9	9,5	7,8

A estrutura das ciclodextrinas assemelha-se, portanto, a um cone com ambos os lados abertos. O lado com diâmetro maior é constituído por grupamentos –OH secundários, provenientes das unidades de glicose. O lado oposto, com diâmetro menor, é constituído por grupamentos –OH primários, que são mais polares, sendo portanto, relativamente hidrofóbicos, enquanto que a superfície oposta é polar. Os grupamentos –OH secundários podem ser derivatizados para aumentar a profundidade da cavidade e/ou mudar a natureza dos sítios para interação polar ^(45, 88, 164, 184, 215)

Devido a presença da unidade de *d*- α -glicose, a ciclodextrina apresenta estereoespecificidade. A cavidade interior é relativamente hidrofóbica e uma grande variedade de compostos solúveis e não solúveis em água, podem encaixar-se dentro dela, formando complexos de inclusão, conforme a Figura 11. Se os compostos são quirais, complexos de inclusão diastereoisoméricos são formados ^(88, 123). Somente isômeros com orientação espacial apropriada encaixam-se na cavidade apolar, enquanto o antípoda, devida sua orientação desfavorável, não se encaixa. A mesma teoria se aplica para o caso de ligações tipo pontes de hidrogênio. Os isômeros com orientação apropriada favorecem a ponte de hidrogênio entre o soluto e os grupos -OH localizados no lado apostado do cone da ciclodextrina ^(4, 215).

Outros fatores que controlam e influenciam o processo de separação enantiomérica incluem: a diferença na constante de ligação dos complexos de ciclodextrina, a diferença na adsorção dos complexos de ciclodextrina na superfície da fase estacionária e a diferença na adsorção das moléculas livres de soluto sobre a camada de ciclodextrina absorvida na superfície da fase estacionária ⁽⁹⁵⁾.

FIGURA 11. Encaixe do soluto na cavidade da β -ciclodextrina ⁽⁴⁾.

Uma série de compostos está sendo estudada utilizando-se β -ciclodextrina, ou como fase estacionária quiral, ou como aditivo quiral na fase móvel. O uso das colunas do tipo ciclodextrina está crescendo rapidamente devido a grande aplicabilidade em separações quirais e por apresentar longa vida útil. A estabilidade relativa dos complexos diastereoisoméricos é responsável pela resolução dos compostos. ^(89, 164, 195, 209)

TABELA 4. COLUNAS QUIRAIS DO TIPO CAVIDADE DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO ^(4, 45, 223)

Fabricante	Nome da fase	Tipo de coluna	Discriminador quiral
Astec	Cyclobond I [®]	Cavidade	β -Ciclodextrina
	Cyclobond II [®]	Cavidade	γ -Ciclodextrina
	Cyclobond I-SP [®]	Cavidade	(S) 2-idroxipropil β -ciclodextrina
	Cyclobond I-RSP [®]	Cavidade	(R/S) 2-idroxipropil β -ciclodextrina
	Cyclobond I-SN [®]	Cavidade	(S)-Nafiletil carbamoil β -ciclodextrina
Merck	Chiradex [®]	Cavidade	β -Ciclodextrina
Serva	ChiralBdex =Si100Polyol	Cavidade	β -Ciclodextrina

2.1.1.3.3. (b) FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO CELULOSE (CHIRALCEL OD®)

A celulose é o polímero natural opticamente ativo mais acessível. Este composto, no entanto, apesar de possuir a propriedade de reconhecimento quiral, não pode ser utilizado para preparação da FEQs devido à falta de rigidez da sua estrutura ⁽⁷⁵⁾.

Os trabalhos do grupo de OKAMOTO ^(108, 150, 151, 152) proporcionaram a obtenção de uma grande variedade de derivados de polissacarídeos tais como: tris-benzoatos, tris-cinamatos e tris-(aril ou benzilcarbamatos) adsorvidos em sílica gel.

As FEQs derivadas de polissacarídeos estão disponíveis comercialmente e têm sido usadas extensivamente ^(46, 58, 60, 68, 150, 190). A diferença de seletividade geralmente é resultado de diferentes estruturas de polissacarídeos (Tabela 5).

Entre os derivados de polissacarídeos, os carbamatos de celulose e de amilose são os mais empregados como fases estacionárias quirais em cromatografia líquida de alta eficiência. A grande vantagem destas fases quirais é que maior variedade de compostos quirais pode ser eficientemente separada ^(46, 196, 225).

A estrutura da fase estacionária derivada da celulose é linear rígida ^(46, 130). As colunas derivadas de celulose são preparadas mecanicamente por deposição destes derivados, sob a forma de um filme fino, sobre a superfície do suporte de sílica ^(46, 150, 184).

As colunas do tipo celulose têm sido utilizadas com sucesso na cromatografia líquida com fase quiral para separações quirais dos fármacos racêmicos, especialmente β -bloqueadores ^(1, 2, 14, 37, 40, 60, 121, 150, 117, 174, 190, 193, 227).

O tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose (Chiralcel OD®) é a fase que tem tido maior aplicabilidade. OKAMOTO e KAIDA ⁽¹⁵⁰⁾ destacam que de 510 racematos por eles analisados, 229 foram completamente resolvidos quando foi empregada a coluna Chiralcel OD®.

Embora o mecanismo de reconhecimento quiral destas colunas ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que a discriminação quiral é possível devido à formação de complexos de inclusão ⁽²⁰⁹⁾ e pelas ligações polares com os grupamentos carbamatos ⁽¹³⁾. O grupamento carbamato interage com o soluto pela ligação hidrogênio com -NH e C=O e ligação dipolo-dipolo com o grupamento C=O. O grupamento hidroxila dos aminoálcoois parece ser importante para o reconhecimento quiral ^(2, 150).

O mecanismo de reconhecimento quiral pela a FEQ derivada de fenilcarbamato de celulose tem sido intensamente estudado. Para tanto normalmente são empregados métodos cromatográficos, computacionais e espectroscópicos ⁽²²⁶⁾. A habilidade de reconhecimento quiral dos fenilcarbamatos de polissacarídeos é altamente influenciada pelo substituinte do anel fenil, uma vez que o substituinte modifica a polaridade do grupo carbamato. Este fato indica que o grupo polar carbamato é muito possivelmente local de adsorção mais importante para que ocorra a separação quiral ⁽²²⁵⁾.

Os enantiômeros podem ser resolvidos, utilizando-se coluna do tipo Chiralcel OD[®], pela formação de complexos diastereoisoméricos entre o soluto e a molécula quiral localizada na fase estacionária. Para a separação enantiomérica dos β -bloqueadores, a ligação entre o hidrogênio do grupo -OH da parte aminoálcool do composto e o grupo carbonila do derivado de fenilcarbamato parecem ser essenciais para o reconhecimento quiral. A Figura 12 apresenta possíveis interações, com a formação de pontes de hidrogênio e interações π - π , que são essenciais para o reconhecimento enantiomérico ^(225, 226). As interações entre as duplas ligações e a inclusão parcial dos enantiômeros na fase estacionária quiral também são fatores importantes. As fases estacionárias quirais são empregadas freqüentemente com fases móveis que consistem de misturas de um solvente apolar (hexano, por exemplo) e um álcool polar ^(13, 58, 117, 150).

Além das fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente, existem outras colunas, como por exemplo, as fases derivadas de carboidratos ⁽²²⁰⁾, as de amilose (S)- α -metilbenzoilcarbamato, que foram empregadas para a separação de derivados de sulfóxidos ⁽¹²⁹⁾ e as de carbamato de celulose que foram utilizadas extensivamente para a determinação de diversas classes de compostos, especialmente β -bloqueadores ^(1, 13, 117, 150).

FIGURA 12. Estereoquímica estrutural da fase estacionária quiral do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil (Chiralcel OD[®]) e possíveis ligações necessárias para reconhecimento quiral do atenolol e do metoprolol (Adaptado com modificações) ^(1, 199, 225).

As colunas de celulose podem ser utilizadas com fases móveis simples, todavia, apresentam algumas limitações, pois, não suportando altas pressões, conduzem à separações lentas e com baixa eficiência.

As colunas do tipo celulose superam todas as limitações das colunas do tipo proteínas imobilizadas e do tipo ciclodextrinas, especialmente na separação de β -bloqueadores. Entre as vantagens que estas colunas (tipo Chiralcel OD[®]) oferecem podem ser citadas:

- i) A alta capacidade de carregamento dos fármacos,
- ii) Os solventes orgânicos, com baixo ponto de ebulição, tipicamente utilizados com este tipo de coluna, facilitam o isolamento dos solutos puros,

- iii) O sistema de solventes orgânicos utilizados em colunas do tipo celulose pode ser removido com facilidade das frações purificadas, o que não ocorre com colunas do tipo ciclodextrina e proteína, com as quais devem ser empregadas soluções tampão na fase móvel,
- iv) A coluna do tipo celulose pode ser utilizada para a separação enantiomérica de diversos tipos de compostos quirais,
- v) Colunas deste tipo, de curto comprimento disponíveis no comércio, são rapidamente equilibradas e permitem separações em pequeno espaço de tempo, além de serem relativamente econômicas.

Recentemente uma série de fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos foram comercializadas para separação enantiomérica de compostos em fase reversa e em fase polar orgânica ⁽¹⁹⁶⁾. As colunas foram capazes de separar enantiômeros de grande número de compostos químicos e farmacêuticos com natureza básica, ácida e neutra. A Tabela 5 apresenta alguns exemplos deste tipo de colunas disponíveis no comércio. A maioria das empresas fornecedoras de colunas quirais disponibilizam serviços de atendimento ao cliente e fornecem ajuda no desenvolvimento e montagem da FEQs atendendo às necessidades específicas dos clientes.

TABELA 5. COLUNAS QUIRAIS DO TIPO POLÍMEROS HELICOIDAIS DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO ^(46, 196)

Fabricante	Nome da FEQ	Tipo de Coluna	Discriminador quiral
Daicel Chemical Industries (Japão) Chiral Technologies Inc. (Estados Unidos de América de Norte)	Chiralcel OD [®]	Helicoidal	Tris dimetilfenil carbamato de celulose
	Chiralcel OD-R [®]	Helicoidal	Tris dimetilfenil carbamato de celulose (Fase reversa)
	Chiralcel OJ [®]	Helicoidal	Tri-4- metilbenzoato de celulose
	Chiralcel OJ-R [®]	Helicoidal	Tri-4- metilbenzoato de celulose (Fase reversa)
	Chiralcel OA [®]	Helicoidal	Triacetato de celulose
	Chiralcel OB [®]	Helicoidal	Tribenzoato de celulose
	Chiralcel OC [®]	Helicoidal	Trisfenilcarbamato de celulose
	Chiralcel OE [®]	Helicoidal	Éter tribenzoilcelulose
	Chiralcel OK [®]	Helicoidal	Tricinamato de celulose
	Chiralpak OT [®] (+)	Helicoidal	Poli(trifenilmetilmetacrilato)
	Chiralpak OP [®] (+)	Helicoidal	Poli(2-piridildifenilmetilmetacrilato)
	Chiralpak WH [®]	Troca de ligantes	Prolina – cobre
	Chiralpak WM [®]	Troca de ligantes	Aminoácido – cobre

2.1.1.3.4 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS DO TIPO ANTIBIÓTICOS MACROCÍCLICOS

Poucos seletores quirais oferecem alto grau de seletividade e boa eficiência para grande número de compostos. Desde a introdução deste tipo da coluna em 1994 por ARMSTRONG ⁽²¹⁶⁾, foi observado que antibióticos macrocíclicos apresentavam alto grau de seletividade para grande número de compostos, com manutenção da eficiência na separação enantiomérica. Poucos seletores quirais na atualidade apresentam estas vantagens ⁽²¹⁶⁾

Os antibióticos macrocíclicos representam uma classe relativamente nova de seletores quirais na área de separações enantioméricas de compostos quirais por CLAE FEQ, eletroforeses capilar e cromatografia em camada delgada, entre outras ⁽⁵⁹⁾.

FIGURA 13. Estrutura química de glicopeptídeos macrocíclicos (a) Vancomicina (Chirobiotic V[®]), (b) Teicoplanin (Chirobiotic T[®]) (39, 216)

Os antibióticos macrocíclicos possuem centros característicos que permitem a interação com analitos de diversas classes de compostos, atuando como seletos quirais. Possuem vários centros esterogênicos e grupos funcionais, permitindo assim, interações múltiplas com moléculas quirais de interesse farmacológico. O mecanismo de separação baseia-se nas interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo, interações π - π , pontes de hidrogênio como também em força de repulsão estérica ⁽²¹⁷⁾. Os estudos mais recentes comprovam envolvimento de interações iônicas ou interações de carga-carga ⁽⁷⁸⁾. As interações potencialmente envolvidas no processo de reconhecimento e a força relativa na separação enantiomérica dos compostos quirais está representada na Tabela 6.

TABELA 6. INTERAÇÕES E FORÇAS RELATIVAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE RECONHECIMENTO QUIRAL POR CHIROBIOTIC V[®] ⁽³⁹⁾

No.	Tipo de Interação	Força Relativa
1	Interações π - π	Muito forte
2	Ponte de hidrogênio	Muito forte
3	Inclusão na cavidade	Fraca*
4	Interação dipolo-dipolo	Força media
5	Repulsão estérica	Fraca
6	Interações iônicas ou interações de carga-carga (aniônica ou catiônica)	Forte

* Fraca em relação à ciclodextrina, entretanto, a cinética de inclusão é mais rápida, assim proporcionando separações enantioméricas em curto intervalo de tempo.

A FEQ derivada de glicopeptídeo, ligada covalentemente, é a mais popular e eficiente. Esta fase pode ser utilizada em cromatografia líquida com fase normal, com fase reversa e com modo orgânico polar, proporcionando separações adequadas ⁽⁵⁹⁾.

Uma série de fases estacionárias quirais do tipo glicopeptídeos são disponíveis no comércio, entre elas destacam-se, a Chirobiotic V[®], a Chirobiotic T[®] e a Chirobiotic R[®] constituídas por vincomicina, teicoplanina e ristocetina, respectivamente, como seletos quirais. A Figura 13 mostra as estruturas químicas dos dois glicopeptídeos mais empregados como fases estacionárias quirais ⁽¹⁰⁾.

As colunas desta classe apresentam uma série de vantagens entre elas ⁽²¹⁶⁾:

- a) Separam enantiômeros de diversas classes de compostos quirais,
- b) Apresentam estabilidade mecânica contra a pressão durante o empacotamento e imobilização, da coluna,
- c) São disponíveis em quantidades suficientes e a custo inferior com relação à outras fases estacionárias quirais,
- d) São semelhantes às colunas com fase quiral do tipo proteína, entretanto, apresentam alta capacidade de carregamento e maior estabilidade
- e) Podem ser utilizadas em fase normal (hexano-etanol) sem mudanças irreversíveis na seletividade e na desnaturação, o que ocorre no caso das colunas derivadas de proteínas,
- f) Podem ser utilizada para cromatografia líquida em escala preparativa.

TABELA 7. COLUNAS QUIRAIS DO TIPO ANTIBIÓTICO MACROCÍCLICO DISPONÍVEIS NO COMÉRCIO ^(39, 216)

Fabricante	Nome da FEQ	Tipo de coluna	Discriminador quiral
Advanced Separation Technologies Inc (ASTEC®)	Chirobiotic V	π - π complexação e pontes de hidrogênio	Glicopeptídeos (Vincomicina)
	Chirobiotic T	π - π complexação e pontes de hidrogênio	Glicopeptídeos (Teicoplanina)
	Chirobiotic R	π - π complexação e pontes de hidrogênio	Glicopeptídeos (Ristocetina)

2.2 β -BLOQUEADORES

Os β -bloqueadores representam o grupo de fármacos mais importantes e prescritos devido ao fato de que as doenças cardiovasculares estão entre as maiores causas de mortalidade mundial ^(17, 58). O pindolol, o nadolol, o betaxolol, o atenolol e o metoprolol, são agentes bloqueadores de receptores β -adrenérgicos empregados principalmente, na angina pectoris, hipertensão, certas arritmias cardíacas e no tratamento do glaucoma ^(49, 72, 96, 117, 134, 186, 227).

Pelo menos um centro quiral é encontrado nas estruturas dos β -bloqueadores na porção α -hidroxietilamina (aminoálcool). Faz exceção o nadolol, que possui três centros quirais ^(2, 17, 134, 186). A maioria dos agentes β -bloqueadores freqüentemente, prescritos são formulados e comercializados na forma racêmica ^(60, 83, 97, 117) embora, para alguns deles, já tenha sido demonstrado que o enantiômero S(-) é o responsável pelo efeito farmacológico principal ^(97, 117, 134, 227) e que a oxidação hepática é altamente estereoespecífica ^(93, 214).

Os dados disponíveis na literatura sobre a atividade farmacológica dos β -bloqueadores indicam que a interação destes agentes com receptores β -adrenérgicos é altamente estereoespecífica ^(107, 134, 145, 156, 186). Normalmente, a atividade β -bloqueadora cardíaca é devida ao isômero S(-), sendo que a razão de atividade entre os enantiômeros pode ser altamente variável. O S-atenolol, por exemplo, apresenta atividade β -bloqueadora cardíaca 46 vezes maior do que seu antípoda ⁽¹⁵⁶⁾. O S-betaxolol é 530 vezes mais ativo do que o R-isômero e o S-metoprolol, 33 vezes mais potente do que suas antípodas ópticas ⁽¹⁴⁵⁾. O S-pindolol foi considerado 200 vezes mais potente do que R-pindolol quanto a atividade bloqueadora de receptores β_1 e β_2 ⁽¹⁰⁷⁾. SRINIVAS e colaboradores ⁽¹⁸⁶⁾ determinaram a ordem de atividade na seqüência decrescente para os quatro enantiômeros do nadolol e observaram que a atividade farmacológica do SQ12151 > SQ12150 > nadolol racêmico > SQ12148 > SQ12149 ⁽¹⁸⁶⁾.

Recentemente, em estudo comparativo sobre a farmacodinâmica do (R, S) atenolol ⁽¹⁸⁹⁾ demonstrou-se que a metade da dose de (S)-atenolol já diminui o batimento cardíaco e a pressão sanguínea no mesmo nível do fármaco racêmico. O (R)-atenolol, por outro lado, apresenta concentração sanguínea significativamente superior à do (S)-atenolol ⁽¹⁸⁹⁾. Entretanto, como já foi observado, não existe diferença no perfil farmacocinético dos enantiômeros do betaxolol, após administração por via oral ou intravenosa. Os enantiômeros do pindolol foram apresentados como exemplos de “clearance renal” estereoespecífico ⁽⁹⁷⁾.

Os agentes bloqueadores β -adrenérgicos são derivados de ariletanolaminas e de ariloxipropanolaminas com valor de pKa entre 9,0 e 10,0 ⁽⁴²⁾. Podem ser representados pela fórmula geral indicada na Figura 14 e Quadro 1, na qual o $-(Ar)$ pode ser um grupo aromático ou outro substituinte adequado, de forma a possibilitar a ocorrência de interações hidrofóbicas e/ou outras, com o sítio receptor. A porção com atividade farmacológica dos agentes bloqueadores β -adrenérgicos consiste num sistema aromático substituído (A) ligado diretamente, ou através de ponte metilênica, à porção α -hidroxietilamínica (B) e a um resíduo alquílico substituído no grupo amino (C).

* carbono assimétrico

FIGURA 14. Fórmula geral dos agentes bloqueadores β -adrenérgicos

QUADRO 1. AGENTES BLOQUEADORES β -ADRENÉRGICOS.

FÁRMACO	Ar =	NUMERO DE ISÔMEROS	NOME QUÍMICO
PINDOLOL		S (-) R (+)	1-[1H-indol-4-iloxil]-3-[isopropilamino]-2-propanol
NADOLOL		RSR > A SRS > RRS > B SSR >	(2R, 3S)-5-[tercibutyl amino]-2-hidroxi-propoxil]-1, 2, 3, 4-tetra-idronaftaleno-2, 3- diol
METOPROLOL		S (-) R (+)	1-[isopropilamina]-3-[p-b-metoxietil] fenoxi] - 2 -propanol
ATENOLOL		S (-) R (+)	4 - [2 ¹ -hidroxi -3 ¹ -(isopropilamino)-propoxil] fenilacetamida
BETAXOLOL		S (-) R (+)	(±)-1-(isopropilamino)-3-[p-ciclo propilmetoxietil] fenoxil] -2-propano

Os bloqueadores β -adrenérgicos são fármacos que inibem seletivamente determinadas respostas do estímulo simpático ou bloqueiam os efeitos produzidos por agentes simpatomiméticos. Interagem com receptores específicos bloqueando os efeitos do estímulo de receptores β e interferem no armazenamento das catecolaminas. Entre eles, o pindolol e o nadolol tem atividade não seletiva sobre receptores adrenérgicos β_1 e β_2 . Por outro lado, o betaxolol, o atenolol e o metoprolol são bloqueadores adrenérgicos cardio-seletivos (β_1). Os agentes bloqueadores β -adrenérgicos agem como antagonistas competitivos do levarterenol no receptor β . Estas substâncias devem seus efeitos inibitórios aos substituintes volumosos ligados ao átomo de nitrogênio. Ao se ligarem ao anel de adenina do ATP, tais substituintes impedem os processos de transferência de próton, muito provavelmente por deslocarem o anel da adenina do seu local de ligação na superfície do receptor^(117, 134, 203).

No Brasil, os agentes β -bloqueadores são comercializados em diversas formas farmacêuticas, tais como soluções injetáveis, soluções oftálmicas e comprimidos ⁽⁵⁴⁾. Os métodos cromatográficos desenvolvidos e padronizados nesta pesquisa serão aplicados na análise de amostras comerciais contendo β -bloqueadores, com o objetivo de avaliar-se a constituição e a pureza isomérica destes fármacos nos medicamentos. Na Tabela 8 estão apresentadas as formulações farmacêuticas selecionadas para a pesquisa.

TABELA 8. MEDICAMENTOS CONTENDO β -BLOQUEADORES NA FORMA RACÊMICA COMERCIALIZADOS NO BRASIL ⁽⁵⁴⁾

FÁRMACO	NOME COMERCIAL	LABORATÓRIO	FORMA ISOMÉRICA	FORMA FARMACÊUTICA
Atenolol	Angipress [®]	Biosintética	Racêmica	Comprimido
	Atenol [®]	Astra Zeneca	Racêmica	Comprimido
	Neotenol [®]	Biobrás	Racêmica	Comprimido
	Atenolol	Neo Química	Racêmica	Comprimido
	Tenoretic [®]	Zeneca	Racêmica	Comprimido
	Atenolol	Knoll / BASF	Racêmica	Comprimido
	Plenacor [®]	Merck Bagó	Racêmica	Comprimido
	Teuto atenolol [®]	Teuto brasileiro	Racêmica	Comprimido
	Atenolol	Cazi	Racêmica	Comprimido
Metoprolol	Lopressor [®]	Novertis	Racêmica	Comprimido
	Seloken [®]	Astra Zeneca	Racêmica	Comprimido
	Seloken [®]	Astra Zeneca	Racêmica	Injetável
Pindolol	Visken [®]	Novartis	Racêmica	Comprimido
Betaxolol	Betoptic [®]	Alcon	Racêmica	Solução oftálmica
	Betoptic-S [®]	Alcon	Racêmica	Suspensão oftálmica
Nadolol	Corgard [®]	Bristol-myers squibb	Racêmica	Comprimido

A maioria dos estudos estereoespecíficos dos β -bloqueadores ^(49, 93) envolvem etapas vagarosas de extração e processos de derivatização, o que se torna inadequado para a análise de rotina. Recentemente, alguns pesquisadores empregaram colunas dos tipos Chiralcel OD[®] (14, 37, 60, 94, 117, 174, 190, 227), β -ciclodextrina ^(60, 90, 215) e α_1 -ácido glicoproteína (AGP) ^(18, 33, 61, 93, 193) e antibiótico macrocíclico (Teicoplanina - Chirobiotic T[®]) ^(119, 140) para a determinação enantiomérica dos β -bloqueadores.

LAMPRECHT e colaboradores empregaram sistema *on-line* para a preparação de amostra biológica (urina) visando a determinação enantiomérica do atenolol empregando fase estacionária derivada do antibiótico macrocíclico glicopeptídeo, a teicoplanina (Chirobiotic T[®]). Os autores do trabalho empregaram dispositivo chamado material de acesso restrito (RAM) para preparação da amostra *on-line*, o que supera parcialmente a limitação associada a análise enantiomérica do atenolol nos fluidos biológicos. Entretanto, empregaram detector de fluorescência não viável para uso rotineiro. Mesmo utilizando detector de fluorescência o limite de quantificação foi de 15 $\mu\text{g/litro}$ ⁽¹¹⁹⁾.

Já em trabalho recente o MISTRY e colaboradores ⁽¹⁴⁰⁾ utilizaram fase estacionária derivada do mesmo antibiótico macrocíclico glicopeptídeo (Chirobiotic T[®]) para separação simultânea de enantiômeros do metoprolol e α -hidroximetoprolol. Entretanto, o método proposto apresenta duas desvantagens, utilização de um detector de fluorescência e o emprego de padrão interno para quantificar os enantiômeros.

As Tabelas de números 9 a 13 apresentam descrição de alguns parâmetros de separação enantiomérica do metoprolol, betaxolol, pindolol, nadolol e atenolol, respectivamente, empregando fases estacionárias quirais de diversas classes. A maioria das determinações foi realizada em amostras biológicas.

TABELA 9. SEPARAÇÕES DO METOPROLOL SEGUNDO A LITERATURA

	COLUNA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO mL/min.	DETECÇÃO (λ nm)	CONC. INJETADA	REFERENCIA
1	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	0,7	276	160 and 80 μ g/mL	40
2	Chiralcel OD [®]	Hexano:etanol:dietilamina (90:10:0,05 v/v/v)	1,0	273	Variável	117
3	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	0,5	275	1000 μ g/mL	60
4	Cyclobond-I [®] β -Cyclodextrin	Acetonitrila:metanol:ácido acético:triethylamina (97:3:24:0,36 v/v/v/v)	1,0	275	1000 μ g/mL	60
5	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol (90:10) + 10 mM octilamina (v/v)	1,0	Fl.	Amostra biológica	190
6	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (91:08:1,0 v/v/v)	1,0	Fl.	25-400 ng/mL	174
7	Chiralcel OD [®]	1-propanol (10%):dietilamina (0,1%):água 600 mg/L em hexano (v/v)	0,5	Fl.	1,2 μ mol/L	14
8	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (75:25:0,05 v/v/v)	1,0	Fl.	Amostra biológica	121
9	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (90:10:0,01 v/v/v)	1,0	Fl.	Amostra biológica	37
10	Chiralcel OD [®]	Dietilamina 10 mM e água 83 mM em hexano:isopropanol (3:1 v/v)	1,0	273	1000 μ g/mL	193
11	α_1 -ácido glicoproteína [®]	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0):metanol (95:05 v/v)	0,9	220	60 μ g/mL	33
12	Chirobiotic T [®] (Teicoplanin)	Acetonitrila:metanol:diclorometano:ácido acético:TEA (56:30:14:0,2:0,2 v/v/v/v)	2,2	Fl	Amostra biológica	140

Fl. = Fluorimétrico

TABELA 10. SEPARAÇÕES DO BETAXOLOL SEGUNDO A LITERATURA

COLUNA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO mL/min.	DETECÇÃO (λ nm)	CONC. INJETADA	REFERENCIA
1 Chiralcel OD [®]	Hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	0,7	276	80 (μ g/mL)	40
2 Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (87:13:0,05 v/v/v)	1,5	273	Variável	117
3 Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	0,5	275	1000 (μ g/mL)	60
4 Cyclobond-I [®] β -Cyclodextrin	Acetonitrila:metanol: ácido acético: trietilamina (97:3:24:0,36 v/v/v/v)	1,0	275	1000 (μ g/mL)	60
5 Chiralcel OJ [®]	Hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (95:4,975:0,025 v/v/v)	1,0	220	Variável	198

TABELA 11. SEPARAÇÕES DO PINDOLOL SEGUNDO A LITERATURA

No.	COLUNA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO mL/min.	DETECÇÃO (λ nm)	CONCENTRAÇÃO INJETADA	REFERENCIA
1	Chiralcel OD [®]	Hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	0,7	276	80 μ g/mL	40
2	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,05 v/v/v)	1,5	273	Amostra biológica	117
3	Chiralcel OD [®]	Acetonitrila : perclorato de sódio aquoso (40: 60 v/v)	0,5	Fl.	Variável	227
4	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (20:80:0,1 v/v/v)	0,5	265	1000 μ g/mL	60
5	α_1 -ácido glicoproteína	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0):metanol (85:15 v/v)	0,9	220	60 μ g/mL	33
6	α_1 -ácido glicoproteína	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0):acetonitrila (90:10 v/v)	0,9	225	20 μ g/mL	18
7	α_1 -ácido glicoproteína	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,3):acetonitrila (90:10 v/v)	0,9	Fl.	Amostra biológica	61

Fl. = Fluorimétrico

TABELA 12. SEPARAÇÕES DO NADOLOL SEGUNDO A LITERATURA

No.	COLUNA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO mL/min.	DETECÇÃO (λ nm)	CONCENTRAÇÃO INJETADA	REFERENCIA
1	Chiralcel OD [®]	Hexano: etanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	0,7	276	200 and 80 μ g/mL	40
2	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:etanol:dietilamina (80:5:15:0,05 v/v/v/v)	1,0	273	Amostra biológica	117
3	α_1 -ácido glicoproteína [®]	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0):isopropanol (96:04 v/v)	0,9	225	20 μ g/mL	18
4	Chiralcel OD [®]	Hexano: etanol:dietilamina (85:15:0,4 v/v/v)	1,0	254	10 nmol	2
5	Chiralpak AD [®]	Hexano: etanol:dietilamina (80:20:0,3 v/v/v)	1,2	270	Variável	130

TABELA 13. SEPARAÇÕES DO ATENOLOL SEGUNDO A LITERATURA

No.	COLUNA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO mL/min.	DETECÇÃO (λ nm)	CONCENTRAÇÃO INJETADA	REFERENCIA
1	Chiralcel OD [®]	Hexano:isopropanol:dietilamina (60:40:0,1 v/v/v)	0,5	275	1000 μ g/mL	60
2	α_1 -ácido glicoproteína [®]	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0)	0,9	220	60 μ g/mL	33
3	α_1 -ácido glicoproteína [®]	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,0)	0,9	225	20 μ g/mL	18
4	Fenil carbamato de β - ciclodextrina	Tampão fosfato 20 mM (pH 4,6):etanol (90:10 v/v)	1,0	Fl.	Amostra biológica	90
5	α_1 -ácido glicoproteína [®]	Tampão fosfato 10 mM (pH 7,2)	0,9	Fl.	Amostra biológica	61
6	(R, R) DACH-DNB	Diclorometano:metanol (98:2 v/v)	1,0	Fl	Amostra biológica	57
7	Chiral CBH	5% de isopropanol em tampão fosfato de sodio (pH 6,8) + 50 μ M cellobiose e μ M50 EDTA-Na	0,9	Fl.	Amostra biológica	71
8	Chirobiotic T [®] (Teicoplanin)	Acetonitrila:metanol:ácido acético:TEA (55:45:0,3:0,2 v/v/v/v)	1,5	Fl.	Amostra biológica	119

DACH-DNB = (R, R)-diaminociclo-hexano dinitrobenzoi

Fl. = Fluorimétrico

2.3 ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES

A maioria dos antiinflamatórios não-esteróides quirais são ácidos arilalcanóicos contendo, pelo menos, um átomo de carbono tetraédrico assimétrico. Normalmente, este carbono quiral está localizado na cadeia lateral, no entanto, pode ser encontrado no anel rígido, como no caso do "ketorolac" ⁽⁵¹⁾

São possíveis quatro estereoisômeros metabólicos do ibuprofeno, RS-(R-ibuprofeno, S-carboxiibuprofeno), SR-, SS e RR-configurações, em decorrência de fato que o ibuprofeno "*in vivo*" é metabolizado a carboxiibuprofeno, incorporando assim outro carbono quiral na molécula ⁽¹⁷³⁾.

A maioria dos antiinflamatórios não-esteróides é comercializada como racemato. O naproxeno é o único membro desta família disponível mundialmente como S-(+)-enantiômero puro. O S-(+)-ibuprofeno (Garbo, Fieberbrunn, Áustria) está disponível para uso clínico na Áustria desde 1994. O S-(+)-ketoprofeno foi aprovado recentemente para ser comercializado na Espanha (Medarini SA, Badalona, Barcelona) ^(51, 65).

A comercialização e disponibilidade clínica do S-antípoda é consequência de longa pesquisa na qual comprovaram-se os resultados desfavoráveis deste antiinflamatório não-esteróide na forma racêmica. Vários trabalhos publicados nos últimos 20 anos comprovaram, que a atividade antiinflamatória do ibuprofeno e do flurbiprofeno é devida ao S-antípoda; que o R-antípoda transforma-se, "*in vivo*", em S-antípoda, sendo essa transformação uni-direcional; e que os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos do ibuprofeno e do flurbiprofeno são estereoespecíficos. Na Tabela 14 estão apresentados os medicamentos selecionados para a pesquisa.

As estruturas químicas dos agentes antiinflamatórios a serem estudados estão apresentadas na Figura 15 e no Quadro 2.

FIGURA 15. Fórmula geral dos agentes antiinflamatórios não-esteróides

QUADRO 2. ESTRUTURAS QUÍMICAS, ENANTIÔMEROS E NOMES QUÍMICOS DOS AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES SELECIONADOS PARA A PESQUISA

FÁRMACO	R ₁	R ₂	NÚMERO DE ISÔMEROS	NOME QUÍMICO
IBUPROFENO		-H	S (-) R (+)	Ácido 2-metil- 4 - [isobutil] fenilacético
FLURBIPROFENO		-F	S (-) R (+)	Ácido 2-fluoro - 2 - metil - 4 - bifenilacético

O ibuprofeno (pKa 4,4 – 5,2) ⁽⁴²⁾ e o flurbiprofeno (pKa 4,2) ⁽¹⁵⁸⁾ são agentes importantes da classe dos antiinflamatórios não-esteróides, derivados do ácido propiônico. Ambos apresentam em comum um grupo carboxílico, separado por um átomo de carbono que faz parte de um núcleo aromático plano. A este núcleo podem estar ligados grupos lipofílicos volumosos. A presença de um substituinte α -metila realça a potência. São portanto, moléculas com caráter ácido fraco. Os efeitos terapêuticos dos antiinflamatórios não-esteróides, bem como seus efeitos adversos, estão relacionados com a síntese das prostaglandinas E2 e PGI2 ^(65, 96).

Os enantiômeros R (-) dos agentes antiinflamatórios não-esteróides (profenos) são desprovidos de capacidade para inibir a síntese de prostaglandinas sendo, portanto, geralmente ineficientes como agentes antiinflamatórios *in vivo*. Em contrapartida, os enantiômeros S (+) são eficientes tanto *in vitro* como *in vivo* ^(66, 99). Exceções para essa regra geral da enantiosseletividade incluem o R (-) ibuprofeno e o R (-)-fenoprofeno, que são farmacologicamente ativos *in vivo* ^(26, 27, 65, 127). Ficou demonstrado que estes compostos exercem ação farmacológica devido a inversão da configuração óptica que ocorre *in vivo* ^(66, 99, 218).

Foi também verificado que o enantiômero R (-) é significativamente menos potente quando comparado com o enantiômero S(+) ou com a mistura racêmica, tanto na atividade antiinflamatória como na toxicidade gastrointestinal ^(26, 27). Por estas razões existe a possibilidade de se utilizar o enantiômero R (-) de agentes antiinflamatórios não-esteróides como analgésicos com efeito antiinflamatório e mínima toxicidade gastrointestinal ^(65, 81, 127).

TABELA 14. MEDICAMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL CONTENDO ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES ⁽⁵⁴⁾.

FÁRMACO	NOME COMERCIAL	LABORATÓRIO	FORMA ISOMÉRICA	FORMA FARMACÊUTICA
Ibuprofeno	Actiprofen [®]	Sanofi	Racêmica	Comprimido
	Advil [®]	Whitehall	Racêmica	Comprimido
	Artil [®]	Farmasa	Racêmica	Comprimido
	Benotrin [®]	E. M. S	Racêmica	Comprimido
	Danilon [®]	Allergan-Frumtost	Racêmica	Comprimido
	Doretrim [®]	Novartis	Racêmica	Comprimido
	Ibufran [®]	Neo Quimica	Racêmica	Comprimido
	Ibuprofeno	União Química	Racêmica	Comprimido
	Ibuprofeno	Teuto Bras	Racêmica	Comprimido
	Ibuprofeno	Bunker	Racêmica	Comprimido
	Motrin [®]	Pharmac Upjohn	Racêmica	Comprimido
	Parartrin [®]	Cazi	Racêmica	Comprimido
Flurbiprofeno	Froben [®]	BASF	Racêmica	Cápsula com ação prolongada
	Ocufen [®]	Allergan-Frumtost	Racêmica	Suspensão oftálmica

Alem do ibuprofeno, o cetoprofeno e outros fármacos do grupo dos antiinflamatórios não-esteróides , são exemplos clássicos de compostos que sofrem inversão quiral no organismo. O (R)-isômero no organismo sofre inversão pela ação enzimática e transforma-se no (S)-isômero. A Figura 16 ilustra a inversão quiral do ibuprofeno ^(31, 120).

FIGURA 16. Inversão quiral do ibuprofeno (R-ibuprofeno $\rightleftharpoons$ S- ibuprofeno) ⁽⁴⁴⁾

COX e colaboradores ⁽⁴³⁾ realizaram um estudo sobre a bioequivalência de duas formulações do ibuprofeno. Os ensaios estereoespecíficos e não estereoespecíficos apresentaram resultados significativamente diferentes. As duas formulações foram consideradas não bioequivalentes do ponto de vista enantiômero individual. Além disso, as duas formulações apresentaram perfis de liberação para o ibuprofeno, significativamente diferentes ⁽⁴³⁾.

JAMALI e colaboradores em 1991 ⁽¹⁰⁴⁾ realizaram um estudo sobre a bioequivalência de duas formulações contendo flurbiprofeno. Os ensaios estereoespecíficos e não estereoespecíficos apresentaram resultados significativamente diferentes. Os resultados obtidos, pelo método estereoespecífico, mostraram diferença significativa entre a área sobre curva (AUC) do S-flurbiprofeno, em ambas formulações. Entretanto, o método não estereoespecífico não apresentou diferença significativa para os dois produtos ⁽¹⁰⁴⁾.

BRUNE e colaboradores ^(27, 127) observaram que o R-flurbiprofeno é ineficaz para inibir a síntese de prostaglandinas, propriedade necessária para a atividade antiinflamatória. No entanto, este composto apresentou efeito anti-nociceptivo em ratos e em seres humanos com potência quase igual a do S-flurbiprofeno. Esses resultados são importantes devido ao fato de que o R-flurbiprofeno não se transforma em seu antípoda. Entretanto, o R-flurbiprofeno é significativamente menos potente do que o S- e R,S-flurbiprofeno quanto a atividade antiinflamatória, apresentando menor toxicidade gastrointestinal ⁽²⁷⁾.

GEISSLINGER e colaboradores ⁽⁸¹⁾ comprovaram que, somente o S-flurbiprofeno apresenta efeito anti-nociceptivo após administração local do isômero individual sobre células inflamadas, entretanto, ambos os enantiômeros apresentaram efeito anti-nociceptivo, quando administrados por via sistêmica.

Pelos dados apresentados na literatura conclui-se que o R-flurbiprofeno deve ser usado como analgésico, uma vez que, além da ação terapêutica mais eficiente, apresenta efeitos tóxicos mais reduzidos ⁽²⁷⁾.

Vários métodos estereoespecíficos de análise para o ibuprofeno e o flurbiprofeno podem ser encontrados na literatura disponível. Os enantiômeros dos agentes antiinflamatórios foram separados utilizando-se a técnica de derivatização ou empregando-se FEQs. Na derivatização ocorre a transformação do grupo carboxílico em éster, em anilido, ou em um grupo amido, o que permite melhor separação com limite de detecção adequado. Em alguns casos, um reagente não quiral foi utilizado para derivatização dos enantiômeros do ácido propiônico. Em seguida procedeu-se à separação utilizando-se uma coluna Chiralcel OD[®] ⁽¹⁴⁹⁾.

2.3.1 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO IBUPROFENO

Os enantiômeros do ibuprofeno, ($\pm$) ácido 2-(4-isobutilfenil)-propiónico, foram inicialmente separados pela formação de diastereoisômeros com (-)-1-feniletilamina. Os produtos metabólicos determinados com este método foram, predominantemente, os com configuração S ⁽³⁾.

A CLAE com a coluna do tipo (R)-N-(3,5-DNB) fenilglicina foi utilizada para a separação enantiomérica do ibuprofeno ^(170, 210). A separação direta do ibuprofeno por CLAE foi obtida empregando-se fase estacionária quiral contendo derivados de amido e de uréia ligados à sílica ⁽¹⁴⁷⁾.

A separação direta do ibuprofeno por CLAE empregando-se coluna do tipo α_1 -ácido glicoproteína foi amplamente utilizada ^(91, 92, 114, 139, 179). Entretanto, esta coluna tem apresentado uma série de desvantagens. Entre elas, a vida útil curta, perfil do pico não adequado para quantificação em baixa concentração e especialmente, baixa resolução.

Fases estacionárias quirais contendo, "ovomucoid", gema de ovo (proteína ligada à riboflavina) e "avidin" foram também empregadas para a separação enantiomérica do ibuprofeno ^(128, 141, 142).

O uso de coluna de sílica revestida com β -ciclodextrina tem sido muito útil na separação enantiomérica do ibuprofeno sem necessidade de derivatização do composto. A coluna foi empregada para determinação dos isômeros em amostras biológicas ⁽⁷⁹⁾. BEESON e colaboradores ⁽¹⁶⁾ e FARKAS e colaboradores ⁽⁶⁸⁾ estudaram o efeito da fase móvel e tampão citrato sobre a seletividade e o tempo de retenção.

A separação isomérica do ibuprofeno foi também efetuada empregando-se a fase estacionária quiral derivada de albumina sérica bovina, coluna comercializada com o nome de, Resolvosil[®] ⁽⁷⁾. A coluna de albumina sérica humana imobilizada sobre sílica também foi utilizada com o mesmo propósito ⁽¹⁴⁶⁾, no entanto, em ambos os casos não foram apresentados dados visando a quantificação em preparações farmacêuticas.

Os isômeros do ibuprofeno foram separados após serem convertidos em anilido derivados, empregando-se coluna do tipo celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) (Chiralcel OD®). Entretanto, não foi possível essa separação quando se utilizou a mesma coluna sem derivatização da molécula ⁽¹⁴⁹⁾.

Empregando-se um sistema com fase estacionária quiral derivada de celulose contendo, simultaneamente, grupos 3,5-dimetilfenilamino carbonila e 10-undecenoil, foi possível a separação dos isômeros do ibuprofeno ⁽¹⁵⁴⁾.

Recentemente, no trabalho não publicado, TACHIBANA e colaboradores relatam a separação enantiomérica do ibuprofeno empregando FEQ derivada de amilose (Chiralpak AS-RH®) em fase reversa. Os autores utilizaram tampão fosfato (pH 2):acetonitrila (60:40 v/v) como fase móvel, com fluxo de 0,5mL/min. No entanto, o referido método apresenta tempo de análise muito longo ($t_1=20,6$ e $t_2=22,32$), inviabilizando assim o emprego em análises de rotina ⁽¹⁹⁶⁾.

Recentemente, vários oligossacarídeos lineares foram utilizados como discriminadores quirais em eletroforese capilar para separação direta e rápida dos isômeros do ibuprofeno ^(53, 171).

2.3.2 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO FLURBIPROFENO

O flurbiprofeno, quimicamente é o ácido (2-(2-fluoro-4-bifenilil)-propionico. Este composto foi cromatografado estereoespecificamente utilizando-se o método de pré-derivatização. Colunas do tipo Pirkle ⁽¹⁷⁰⁾ e do tipo celulose trisfenilcarbamato ⁽¹³¹⁾ foram empregadas para a separação do flurbiprofeno sob a forma de amido derivado.

FIGURA 17. Estrutura estereoespecífica do (R) e do (S)-flurbiprofeno, mostrando a conformação espacial da molécula ⁽³⁸⁾.

A maioria dos métodos analíticos para determinação do flurbiprofeno é indicada para aplicação em amostras biológicas, envolvendo etapas longas, sistemas de solventes não isocráticos com mudança de fases móveis e empregando detectores do tipo de fluorescência para determinação de produtos metabólicos ⁽¹¹⁴⁾.

O método proposto por ALLENMARK e colaboradores ⁽⁷⁾ aconselha o emprego de uma coluna do tipo albumina sérica bovina ligada a sílica (Resolvosil[®]), que mostrou ser eficiente para a separação enantiomérica do flurbiprofeno. No entanto, não foram apresentados na referência, dados sobre a validação do método.

A separação dos enantiômeros do flurbiprofeno foi também efetuada utilizando-se coluna do tipo amilose tris-3,5-dimetilfenilcarbamato ⁽²⁰⁶⁾. Uma coluna com albumina sérica humana, imobilizada sobre sílica, foi utilizada para a separação enantiomérica do flurbiprofeno ^(92, 146).

Outras colunas utilizadas para separação enantiomérica do flurbiprofeno foram as de fases estacionárias quirais contendo alcalóides do ergot ⁽³²⁾; gema de ovo (proteína ligada a riboflavina) ⁽¹²⁸⁾; polisiloxano ⁽²⁰¹⁾; e as derivadas de amido e uréia, sempre ligadas à sílica ⁽¹⁴⁷⁾. Entretanto, todos os métodos descritos apresentam como principal desvantagem a complexidade, não podendo ser utilizados para análises de rotina, pois envolvem muitas etapas na preparação das amostras e das fases móveis.

TACHIBANA e colaboradores ⁽¹⁹⁶⁾ recentemente, relataram a separação enantiomérica do flurbiprofeno empregando a FEQ derivada de amilose (Chiralpak AS-RH[®]) em fase reversa. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato (pH 2):acetonitrila (80:20 v/v) com fluxo de 0,5mL/min. No entanto, o referido método apresentou tempo de análise muito longo ($t_1=22,71$ e $t_2=29,48$), inviabilizando assim o emprego em análises de rotina.

A maioria das técnicas citadas apresenta grande número de desvantagens. Muitas vezes o processo preparatório é longo, envolvendo, freqüentemente, pré-derivatização ^(80, 103, 114, 131, 183). A validação do processo não é definida, assim como também o limite de sensibilidade ^(80, 154, 183).

Recentemente, a cromatografia com fluido supercrítico ^(103, 157, 200) e a eletroforese capilar empregando β -ciclodextrina ⁽¹⁰⁹⁾, têm sido métodos úteis para a separação enantiomérica do flurbiprofeno.

A eletroforese capilar (EC) ainda apresenta algumas deficiências com relação ao número e variedade de seletores quirais que são limitados pela solubilidade e características de detecção. Vários seletores quirais utilizados para separação em EC apresentam absorção forte em comprimento de onda menor do que 254nm, limitando assim a aplicação do método ⁽²¹⁶⁾.

Além disso, estas técnicas são novas e são ainda necessários estudos mais profundos para que sejam empregadas em análise de medicamentos. São poucos os centros analíticos no Brasil que possuem infra-estrutura para aplicar os métodos anteriormente citados.

TABELA 15. SUMÁRIO DA RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA DO IBUPROFENO POR CLAE-FEQ

No.	COLUNA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO (mL/min.)	DETECÇÃO (λ nm)	CONCENTRAÇÃO INJETADA	REFERÊNCIA
1	Cyclobond I [®]	Acetonitrila: 0,1% tampão acetato de trietilamônio (30:70 v/v) pH=7,5	1,0	220	100 μ g/mL	79
2	Enantiopac [®]	0,5% 2-propanol 5mM DMSO em 20mM tampão fosfato (pH=6,7)	1,0	220	100 μ g/mL	139
3	Chiral-AGP [®]	1,2% isopropanol 1,2 mM N, N-dimetiloctilamina em 0,02 M NaH ₂ PO ₄ (pH=5,5)	1,0	227	1000 μ g/mL	162
4	Chiral-AGP [®]	Tampão fosfato (0,01 M KH ₂ PO ₄ – 0,1M KH ₂ PO ₄)	1,0	225	Variável	30
5	Albumina humana imobilizada na fase diol	KH ₂ PO ₄ – Na ₂ HPO ₄ (pH=6,9) modificado com ácido octanóico e 18% de acetonitrila	1,0	254	Amostra biológica	146
6	microboro alcalóide ergot	0,05 M acetato de potássio – acetonitrila	1,0	254	Variável	32
7	Cyclobond I [®]	70 mM tampão citrato – acetonitrila - água com trietanolamina	1,0	254	Variável	68
8	Cyclobond I [®]	5 mM tampão citrato – acetonitrila	1,0	254	Variável	16
9	Allyl-TER [®] (1-allyl-terguride)	20mM acetato de potássio (pH3,6):acetonitrila (50:50 v/v)	1,0	254	1 mg/mL	155
10	Chiral-AGP [®]	0,4% (v/v) de isopropanol em 0,1M tampão fosfato (pH 7,0)	0,9	220	Variável	207

TABELA 16. SUMÁRIO DA RESOLUÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FLURBIPROFENO POR CLAE-FEQ

NO.	COLUNA USADA	SISTEMA DE SOLVENTE	VAZÃO (mL/min)	DETECÇÃO (λ nm)	CONCENTRAÇÃO INJETADA	REFERENCIA
1	Chiral-AGP [®]	5% isopropanol 1 mM N, N-dimetiloctilamina em 20,0 mM tampão fosfato (pH=6,5)	1,0	246nm	1000 μ g/mL	80
2	Cyclobond I SN [®]	5 mM tampão citrato (pH 6,0) – acetonitrila variável entre 30 e 50 %	1,0	254	Variável	16
3	Cyclobond I SP [®]	5 mM tampão citrato (pH 4,0) – acetonitrila variável entre 20 e 40 %	1,0	254	Variável	16
4	Cyclobond I RSP [®]	5 mM tampão citrato (pH 4,0) – acetonitrila variável entre 20 e 40 %	1,0	254	Variável	16
9	Allyl-TER [®] (1-allyl-terguride)	20mM acetato de potássio (pH3,6): acetonitrila (50:50 v/v)	1,0	254	1,0 mg/mL	155
10	Chirobiotic V [®]	100mM tampão nitrato de amônio (pH5,0): tetraidrofurano (80:20 v/v)	1,0	275	0,2mM (5 μ L)	158

2.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Atualmente existe muito pouca informação sobre validação de métodos analíticos para determinação e quantificação de enantiômeros. No início desta década, providências foram tomadas, de maneira tímida, pelas comissões das farmacopéias de alguns países, para elaboração de diretrizes sobre a fabricação e comercialização de fármacos quirais ^(24, 64, 172, 204).

A Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾ fornece informações sobre a proporção dos diastereoisômeros do labetalol. Entretanto, não foram encontradas informações sobre a pureza ou razão dos enantiômeros de outros fármacos quirais já incluídos na mesma farmacopéia. Iniciativas mais concretas foram tomadas pela Comunidade Européia e vários fármacos quirais foram comercializados na forma enantiomericamente isolada. A Farmacopéias Européias ⁽⁶⁴⁾ e Britânica ⁽²⁴⁾ descrevem-se método para determinação diastereoisomérica do labetalol empregando cromatografia gasosa.

Alguns órgãos governamentais têm publicado diretrizes sobre validação em geral. Por exemplo, as exigências para a metodologia analítica nos Estados Unidos são descritas nos artigos federais legalmente aplicados estabelecendo padrões mínimos para a Indústria Farmacêutica. Estas normas exigem que os métodos de análise utilizados para assegurar a conformidade dos produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas, devem atender a padrões adequados da exatidão e confiabilidade ^(25, 178, 204).

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo através do qual estudos de laboratório são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas, fornecendo uma evidência documentada de que o método realiza a tarefa para a qual é indicado ^(25, 100, 101, 105, 126, 172, 204).

A Farmacopéia Americana 24ed ⁽²⁰⁴⁾ possui uma série específica de parâmetros de desempenho analítico cuja determinação permite o julgamento da confiabilidade do método em estudo. Essas especificações estão descritas no Capítulo 1225 dos Testes Gerais e são reconhecidas como as oito fases da validação de métodos ou como parâmetros de desempenho analítico ⁽¹⁷⁵⁾.

A "International Conference on Harmonization" (ICH) ^(100, 101) também publicou recentemente a própria lista de características importantes da validação para vários tipos de ensaios ^(100, 101). Da mesma maneira a "Association of Official Analytical Chemists International" (AOAC INTERNATIONAL) fornece orientações sobre os procedimentos para o processo de validação ⁽¹¹⁾.

Os parâmetros de desempenho analítico são os seguintes.

- Exatidão
- Precisão
- Especificidade
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Linearidade e faixa de variação
- Resistência
- Robustez

Tanto a Farmacopéia Americana 24ed. quanto a ICH reconhecem que não existe necessidade de se avaliar em todos os casos os parâmetros de desempenho analítico. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros que devem ser avaliados ⁽¹⁷⁵⁾.

A Farmacopéia Americana 24ed. classifica os métodos analíticos em três categorias ⁽²⁰⁴⁾, conforme Tabela 17, onde:

A Categoria I inclui métodos usados para a quantificação da maioria dos componentes de excipientes e princípios ativos. Para este tipo de ensaio, no qual o analito deve estar presente em quantidade suficiente, parâmetros como exatidão e precisão são considerados necessários, enquanto que medidas da sensibilidade do ensaio (ex: LD e LQ) não são exigidas. A Categoria II inclui os métodos que são usados para determinação de impurezas em excipientes e produtos de degradação no produto final. A importância dos parâmetros de sensibilidade é muito maior, uma vez que há possibilidade da quantidade do analito ser relativamente pequena. A Categoria III inclui métodos usados para medir as características de desempenho do produto como, dissolução, desintegração, etc., ou seja são dependentes da natureza do teste.

Separação enantiomérica de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida com fase estacionária quiral
Anil Kumar Singh – Tese para obtenção do grau de DOUTOR FCF/USP 2002

--- -- -- -- --
LQ - Limite de quantificação

A ICH, o órgão europeu que fornece orientação sobre requerimento técnico para registro de produtos farmacêuticos, disponibilizou recomendações para proceder-se à validação de um método analítico. A ICH classifica os métodos analíticos de maneira similar a da Farmacopéia Americana, 24ed, conforme está descrito na Tabela 18, onde a:

Identificação → assegura a identidade do analito na amostra;

Testes de impurezas → verifica as características de impureza de uma amostra;

TABELA 17. RECOMENDAÇÕES PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS CLASSIFICADOS DE ACORDO COM A FARMACOPÉIA AMERICANA 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾

Parâmetros analíticos	Ensaio Categoria I	Ensaio Categoria II		Ensaio Categoria III
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Sim	Sim	*	*
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*
LD	Não	Não	Sim	*
LQ	Não	Sim	Não	*
Linearidade	Sim	Sim	Não	*
Faixa de Variação	Sim	Sim	Não	*
Resistência	Sim	Sim	*	*
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim

* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

A ICH, o órgão europeu que fornece orientação sobre requerimento técnico para registro de produtos farmacêuticos, disponibilizou recomendações para proceder-se à validação de um método analítico. A ICH classifica os métodos analíticos de maneira similar a da Farmacopéia Americana, 24ed, conforme está descrito na Tabela 18, onde a:

Identificação → assegura a identidade do analito na amostra;

Testes de impurezas → verifica as características de impureza de uma amostra;

Doseamento → mede o analito presente em uma determinada amostra.

TABELA 18. CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES DE VALIDAÇÃO DE ACORDO COM A ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION) PARA VÁRIOS TIPOS DE ENSAIOS ANALÍTICOS ⁽¹⁰⁰⁾.

Parâmetros	Identificação	Teste de impureza		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Tipo de ensaio				
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão:				
Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Intermediário	Não	Sim ³	Não	Sim ³
Reprodutibilidade	Não	Não ¹	Não	Não ¹
Especificidade	Sim	Sim	Sim	Sim ²
LD	Não	Não	Sim	Não
LQ	Não	Sim	Não	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Faixa de Variação	Não	Sim	Não	Sim

1 Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

2 Pode não ser necessário em alguns casos

3 Se a reprodutibilidade for efetuada, a precisão intermediária não é recomendável

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

Os fármacos que estão sendo testados em ensaios clínicos ou que foram aprovados para o mercado, necessitam de métodos analíticos para o controle de identidade, qualidade, pureza e potência, bem como para determinação das características de estabilidade. Todos estes métodos analíticos precisam ser validados. Em caso de compostos quirais os cuidados devem ser redobrados durante o processo de validação do método.

O planejamento dos estudos de validação é um aspecto fundamental para garantir que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos e que o método forneça informações confiáveis. Trata-se de parte integrante do Controle de Qualidade.

3. JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento do número de substâncias quirais em uso na terapêutica e a constatação de comportamentos biológicos diferentes dos enantiômeros, houve a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos mais específicos e sensíveis que fossem capazes de determinar, separar e quantificar os isômeros ópticos. Entre as técnicas analíticas empregadas estão a espectroscopia de ressonância magnética, a calorimetria, a diluição isotópica, a análise quantitativa enzimática e o imunoensaio enantiosseletivo, que são técnicas nas quais a resolução dos isômeros não ocorre por separação. Já nas técnicas cromatográficas, a resolução é feita por separação dos isômeros ^(184, 183).

A determinação da composição estereoisomérica dos fármacos e sua identificação individual é de importância significativa. Para assegurar a invulnerabilidade e a eficiência de um fármaco é necessário isolá-lo e examinar cada um dos enantiômeros. Além disso, é necessário verificar e controlar a composição estereoquímica dos fármacos, desde que, isômeros impuros podem apresentar efeitos toxicológicos, farmacológicos ou outros efeitos indesejáveis.

A diferença de atividade terapêutica, farmacocinética, e/ou farmacodinâmica dos estereoisômeros despertou a necessidade do estudo e desenvolvimento de métodos exatos e precisos para a determinação da pureza isomérica dos produtos farmacêuticos e/ou químicos. Às vezes, estas diferenças predominam entre os enantiômeros, cujos estereoisômeros são de separação difícil. Levando-se em consideração esses fatos e visto que em futuro próximo existe a possibilidade de comercialização dos fármacos em forma isomericamente pura, foi proposto neste trabalho, o desenvolvimento e a padronização de metodologia exata e precisa que possa ser utilizada para a análise de medicamentos contendo substâncias ativas racêmicas e/ou os enantiômeros puros.

Os β -bloqueadores e antiinflamatórios não-esteróides estudados neste trabalho são bastante utilizados no Brasil, principalmente o atenolol, o metoprolol, o pindolol, o betaxolol e o nadolol como também o ibuprofeno e o flurbiprofeno. Este fato pode ser confirmado pela observação do grande número de especialidades farmacêuticas à disposição no mercado, como mostram as Tabelas 8 e 14.

O controle de qualidade quiral destes produtos é ainda deficiente. Tal fato pode ser constatado pela verificação da carência de metodologia analítica enantiosseletiva, oficial ou não, para a determinação destes fármacos em medicamentos. Além disso, existe número muito reduzido de fármacos disponíveis no Brasil, na forma enantiomericamente isolada.

Até o momento, existem poucas informações na literatura sobre a validação de métodos para determinação dos enantiômeros em diferentes formas farmacêuticas, embora, a separação enantiomérica de compostos quirais, tais como, β -bloqueadores e antiinflamatórios não-esteróides, utilizando diversas colunas quirais, pode ser encontrada na literatura.

Durante a última década, para atender o crescimento da tecnologia das separações quirais, tem havido um aumento notável no número (mais de um cento) de FEQs ⁽⁴⁾. A maioria dos estudos de separação de β -bloqueadores, como também de antiinflamatórios não-esteróides tem sido realizada utilizando-se colunas do tipo Chiralcel OD[®], α_1 -ácido glicoproteína e β -ciclodextrina. A coluna do tipo glicoproteína apresenta uma série de desvantagens, pois, além de não ser econômica, apresenta curto tempo de vida útil.

As colunas quirais disponíveis no comércio são tão diversas e variadas que é difícil selecionar uma para a realização de estudos quantitativos. Nesta pesquisa foi escolhida a coluna do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil (Chiralcel OD[®]) devido ao fato de que em muitos trabalhos citados na literatura, esta é a coluna mais utilizada, principalmente para a separação de β -bloqueadores. Além disso, foi empregada para realização de separações enantioméricas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle Físico Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos ⁽⁴⁰⁾. Entre 510 compostos racêmicos testados, 229 (quase 62% deles) foram completamente separados com esta coluna. A estatística comprova que 40 % de todas as colunas analíticas e 70 % de

todas as colunas preparativas derivadas de celulose, são do tipo Chiralcel OD[®]. Os melhores resultados para separações de β -bloqueadores tem sido obtidos com a coluna Chiralcel OD[®] (4). No caso da separação dos enantiômeros de antiinflamatórios não-esteróides, a coluna mais empregada tem sido a β -ciclodextrina (Chiradex[®]) e a recém disponibilizada no comércio, a Whelk-O 1[®], inicialmente desenvolvido para separação enantiomérica da naproxeno.

Com base nos dados da literatura e em pesquisas anteriormente realizadas por SANTORO e colaboradores (40, 41, 177) foram escolhidas as colunas do tipo Chiralcel OD[®], Chiradex[®], α -Burke-2[®] e Whelk-O 1[®], para testes preliminares de separação e posteriormente, quantificação dos isômeros das substâncias selecionadas no presente projeto.

Houve necessidade de realização dos testes preliminares para a separação completa dos isômeros seguidos do estabelecimento das condições ótimas de análise. Todo método analítico, antes de ser aplicado na análise de qualquer tipo de amostra, deve ser validado de acordo com rigorosas etapas como as recomendadas pela Farmacopéia Americana 24ed. (204) e pela AOAC INTERNATIONAL (11). Assim, inicialmente foram otimizadas as condições ideais dos métodos, variando-se a composição das fases móveis, da vazão, dos comprimentos de onda para detecção no UV e estudados e padronizados inúmeros outros parâmetros analíticos.

A falta de métodos analíticos validados para a separação e quantificação de enantiômeros de β -bloqueadores e antiinflamatórios não-esteróides mais prescritos para uso clínico, entre eles, o atenolol, metoprolol, pindolol, betaxolol, nadolol, ibuprofeno e flurbiprofeno, em preparações farmacêuticas, foi a principal justificativa para a realização deste trabalho.

4. OBJETIVOS

O objetivo principal foi a separação enantiomérica, a determinação de ordem de eluição e a obtenção das condições ideais para a separação enantiomérica do metoprolol, atenolol, pindolol, nadolol, betaxolol, ibuprofeno e flurbiprofeno empregando método de CLAE-FEQ. Para tanto, foram empregadas fases estacionárias quirais de diversas classes como, derivada de celulose (Chiralcel OD[®]), derivada de dinitrobenzoil (α -Burke-2[®] e Whelk-O 1[®]) e de sílica revestida com β -ciclodextrina (Chiradex[®]). Nos ensaios preliminares foram estudados os efeitos de composição das fases móveis, da vazão da fase móvel, dos comprimentos de onda para detecção no UV e outros parâmetros analíticos visando as separações propostas.

Após separação e otimização das condições analíticas e instrumentais, realizou-se a validação dos métodos específicos para a separação enantiomérica de cada fármaco de modo a obter-se uma separação rápida, por um método sensível, exato e preciso.

Os métodos validados foram em seguida aplicados para a determinação enantiomérica quantitativa do metoprolol, atenolol e flurbiprofeno, em formulações farmacêuticas comerciais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E SOLVENTES

Hexano, Merck® grau cromatográfico,
Isopropanol, OmniSolv® grau cromatográfico,
Etanol OmniSolv® grau cromatográfico,
Acetonitrila, OmniSolv® grau cromatográfico,
Diclorometano, OmniSolv® grau cromatográfico,
Metanol OmniSolv® grau cromatográfico,
Etanol absoluto, Merck® grau analítico,
Dietilamina, Aldrich® grau analítico,
Trietilamina, Aldrich® grau analítico,
Ácido acético glacial, Merck® grau analítico,
Ácido trifluoroacético, Aldrich® grau analítico,
Citrato de sódio, Merck® grau analítico,
Ácido cítrico, Merck® grau analítico,
Acetato de amônio, Merck® grau analítico,

5.1.2 FÁRMACOS PADRÃO

- (R, S) – Pindolol, Aldrich[®], Milwaukee, WI, USA
- (R, S) – Metoprolol R (+) tartarato, Sigma[®], St. Louis, MO, USA
- (R) – Metoprolol cloridrato, AstraZeneca, Suécia
- (S) – Metoprolol cloridrato, AstraZeneca, Suécia
- (R, S) – Atenolol, Sigma[®], St. Louis, MO, USA
- R (+) – Atenolol, Aldrich[®], Milwaukee, WI, USA
- S (-) – Atenolol, Aldrich[®], Milwaukee, WI, USA
- (R, S) – Nadolol, Sigma[®]
- Cloridrato de (R, S) – betaxolol, gentilmente cedido por uma indústria farmacêutica e empregado como substância química de referência sem ulterior purificação
- (R, S) – Flurbiprofeno, Aldrich[®], Milwaukee, WI, USA
- S(+) – Flurbiprofeno, Aldrich[®], Milwaukee, WI, USA
- S(+) - Ibuprofeno, Aldrich[®], Milwaukee, WI, USA
- (R, S) – Ibuprofeno, gentilmente cedido por uma indústria farmacêutica e empregado como substância química de referência sem ulterior purificação

Estes compostos foram adquiridos comercialmente e empregados como substâncias químicas de referência sem prévia purificação e testes analíticos. A pureza do (R)-metoprolol cloridrato e (S)-metoprolol cloridrato, foi determinada por injeção individual no cromatógrafo, nas mesmas condições das respectivas análises.

5.1.3 AMOSTRAS

As amostras que foram estudadas e analisadas estão apresentadas na Tabela 19:

TABELA 19. AMOSTRAS COMERCIAIS DO ATENOLOL, DO METOPROLOL E DO FLURBIPROFENO SELECIONADAS PARA APLICAÇÃO DOS MÉTODOS PADRONIZADOS

FÁRMACO	FORMA FARMACÊUTICA (QUANTIDADE)	NOME COMERCIAL	INDÚSTRIA FARMACÊUTICA
Atenolol	Comprimidos (100 ,0 mg)	Amostra A - Angipress [®]	Biosintética
		Amostra B - Atenolol	BASF (Generix)
		Amostra C - Neotenol [®]	Biobrás
		Amostra D - Atenol [®]	Zeneca
Tartarato de metoprolol	Comprimidos (100 ,0 mg)	Amostra E - Lopressor [®]	Biogalênica
Flurbiprofeno	Cápsula com ação prolongada (200 ,0 mg)	Amostra F – Froben SR [®]	BASF

5.1.4 EQUIPAMENTOS

Além dos equipamentos comumente empregados em laboratórios, foram utilizados os seguintes:

- Espectrofotômetro Beckman DU série 70, acoplado à impressora, com cubeta de 1 cm;

Sistema I (CLAE)

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, modelo Varian 5000 (Varian[®] Associates, CA, USA);
- Válvula giratória de injeção, modelo 7125, Rheodyne[®] com um “loop” de 20µL;
- Detector de ultravioleta variável, Varian modelo 4000;
- Integrador modelo 4400, (Varian Associates, CA, USA);

Sistema II (CLAE)

- O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência empregada é composto por:
 - “software” controlador *LC Workstation Class-VP* (Shimadzu Corporation, Japão);
 - controlador de sistema modelo SCL-10Avp (Shimadzu Corporation, Japão);
 - injetor automático com “loop” de 50µL modelo SIL-10 AD vp (Shimadzu Corporation, Japão);
 - sistema de bombeamento de solvente modelo LC-10Advp (Shimadzu Corporation, Japão);
 - sistema de degaseificação “on-line” modelo DGU-14A (Shimadzu Corporation, Japão);
 - forno para controlar temperatura da coluna modelo CTO-10AC vp (Shimadzu Corporation, Japão);
 - detector UV/Vis “photodiode array” modelo SPD-M10Avp (Shimadzu Corporation, Japão);

- Fase estacionária quiral: Chiralcel OD[®] (250 x 4,6 mm d.i) (carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil em partículas de sílica de 10µm (Daicel Chemical Industries, Ltd. Japão);
- Fase estacionária quiral: Chiradex[®] (250 x 4,6 mm d.i) (partículas de sílica gel esféricas de tamanho 5µm ligadas covalentemente à β-ciclodextrina, E. Merck, Frankfurt, Alemanha);
- Fase estacionária quiral: "Brush-Type" α-Burke-2* (250 x 4,6 mm d.i) (derivada de dimetil-N-3,5-dinitrobenzoil-α-amino-2,2-dimetil-4-pentilfosfonato, ligada covalentemente a partículas de sílica gel esféricas de tamanho 5µm, do tipo mercaptopropil., Regis Technologies Inc. Illinois, USA.);
- Fase estacionária quiral (S, S) Whelk-O 1[®] (250 x 4,6 mm d.i.) [(3S, 4S)-4-(3, 5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetraidro-fenentereno] depositada sobre partículas de sílica gel 5µm, 100 Å (Regis Technologies, Inc. USA);
- Ultra-som modelo Thorton T-14,
- Aparelho de filtração à vácuo,
- Balança analítica com precisão de quatro casas, modelo Mettler Toledo AB204, Suíça,
- Membrana de filtro hidrofóbica Millipore[®] GVHP 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, USA)
- Membrana de filtro hidrofílica Durapore[®] PVDF 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, USA)
- Unidade filtrante HV Millex em polietileno com membrana Durapore[®] 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm não estéril (Millipore Corporation, MA, USA)
- Membrana Millipore[®] FGLP 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm, não estéril (Millipore Corporation, MA, USA)

5.2 MÉTODOS

5.2.1 DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO

Foram pesados exatamente 20,00 mg do pindolol, nadolol, atenolol, metoprolol e betaxolol separadamente e transferidos para cinco balões volumétricos de 50mL. Os volumes foram completados com etanol absoluto, obtendo-se soluções de 400,0 µg de fármaco/mL. Foram transferidas alíquotas de 5,0mL das soluções obtidas (400,0 µg/mL) para cinco balões volumétricos de 25mL. Os volumes dos balões (contendo 5mL de solução 400,0 µg/mL do fármaco) foram completados com a fase móvel [hexano:isopropanol (70:30 v/v)], obtendo-se soluções contendo 80,00 µg de fármaco/mL.

Foram pesados exatamente 20,00 mg do ibuprofeno e flurbiprofeno separadamente e transferidos para dois balões volumétricos de 50mL. Os volumes foram completados com etanol absoluto, obtendo-se soluções de 400,0 µg de fármaco/mL. Foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das soluções obtidas (400,0 µg/mL) para dois balões volumétricos de 25mL. Os volumes dos balões foram completados com a fase móvel [hexano:isopropanol (70:30 v/v)], obtendo-se soluções contendo 16,00 µg do ibuprofeno/mL e 16,00 µg do flurbiprofeno/mL.

Os espectros de absorção, nas faixas ultravioleta e visível, foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU série 70, acoplado à impressora, em cubeta de 1 cm.

5.2.2 ESTUDOS PRELIMINARES PARA OS β -BLOQUEADORES

5.2.2.1 SEPARAÇÕES DOS ISÔMEROS DOS β -BLOQUEADORES

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros dos β -bloqueadores foram padronizadas através do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, usando coluna do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil (Chiralcel OD[®]) como fase estacionária quiral. As amostras foram cromatografadas na temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 μ L e vazão variando entre 0,5 e 1,0 mL/min. Normalmente, a detecção foi feita em 276nm. Outros comprimentos de onda foram empregados para melhorar a detecção e diminuir a absorção dos picos dos solventes. Outras variações das condições de análise serão apresentadas mais adiante.

5.2.2.1.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DOS β -BLOQUEADORES

Foram pesados exatamente 50,00 mg do atenolol, pindolol, nadolol, metoprolol e betaxolol separadamente e transferidos para cinco balões volumétricos de 50mL. Foram adicionados 40mL de etanol absoluto e a solução foi agitada em ultra-som por 10 minutos. Os volumes foram completados com etanol absoluto, obtendo-se soluções contendo 1000 μ g de fármaco/mL. A partir destas soluções diluições foram efetuadas transferindo-se aliquotas para balões volumétricos e completando-se os volumes com a respectiva fase móvel. As soluções iniciais foram armazenadas a -18°C e protegidas da luz, por não mais de dois meses. Todas as soluções apresentaram estabilidade durante este período, fato que comprova os dados da literatura ⁽³⁶⁾.

As soluções finais do pindolol, metoprolol, atenolol, betaxolol, nadolol foram filtradas através da membrana Millipore[®] FGLP 0,45 μ m de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm não estéril (Millipore Corporation, MA, USA), antes de serem injetadas no sistema, para evitar entrada de impurezas e partículas maiores na coluna.

5.2.2.2 SEPARAÇÕES DOS ISÔMEROS DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES

Na primeira etapa, fase estacionária quiral do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil (Chiralcel OD[®]) foi empregada visando a separação dos enantiômeros do ibuprofeno e do flurbiprofeno. As separações obtidas não foram satisfatórias, assim foram utilizadas as fases estacionárias quirais: Chiradex[®], α -Burke 2[®] e Whelk-O 1[®].

Os compostos foram cromatografados na temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 μ L. Com intuito de melhorar a separação e diminuir o tempo de análise, a vazão da fase móvel foi testada no intervalo entre 0,5 e 1,2 mL/min. A detecção foi efetuada no UV nos comprimentos de onda 225, 246, 248 e 254nm. As condições foram modificadas sempre levando-se em consideração os limites máximos e seguros de pressão e vazão a que a coluna pode ser submetida. Outros parâmetros instrumentais foram otimizados de acordo com as condições analíticas. As variações e as diferentes condições estudadas serão apresentadas na parte de RESULTADOS.

5.2.2.2.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES

Foram pesados exatamente 20,00 mg do ibuprofeno e transferidos para balão volumétrico de 50mL. Foram adicionados 40mL de etanol e a solução foi agitada em ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado com etanol absoluto, obtendo-se solução de 400,0 μ g do ibuprofeno/mL. A solução inicial etanólica contendo 400,0 μ g/mL do flurbiprofeno foi preparada seguindo-se o mesmo procedimento. A partir destas soluções iniciais, diluições foram efetuadas transferindo-se alíquotas para balões volumétricos e completando-se o volume com a respectiva fase móvel. As soluções iniciais foram armazenadas a -18°C protegidas da luz até serem utilizadas, por não mais de um mês. Todas as soluções apresentaram estabilidade durante este período.

Todas as soluções foram filtradas através de membrana Millipore® FGLP 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm, não estéril (Millipore Corporation, MA, USA), antes de serem injetadas, para evitar entrada de impurezas e partículas, causando eventuais danos à coluna.

5.2.2.3 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA CHIRALCEL OD®

As fases móveis foram constituídas por misturas de hexano, etanol, 2-propanol, dietilamina e/ou ácido acético. Após a preparação, as fases móveis foram filtradas através de membrana hidrofóbica, 0,45µm, Millipore® GVHP e desgaseificadas em ultra-som por 20 minutos antes do uso.

5.2.2.4 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA CHIRADEX®

As fases móveis foram constituídas por misturas de acetonitrila, metanol, tampão citrato, ácido acético e/ou trietilamina. Após a preparação, as fases móveis foram filtradas através de membrana de filtro hidrofílico Durapore® PVDF 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, USA) e desgaseificadas em ultra-som por 20 minutos antes do uso.

A fase estacionária quiral foi estabilizada durante 60 a 90 minutos com a fase móvel antes de se dar início às injeções a fim de equilibrar-se a coluna quiral e estabilizar-se o sistema.

5.2.2.5 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA α -BURKE 2[®]

As fases móveis foram constituídas por misturas de diclorometano, acetonitrila, hexano, isopropanol, etanol, metanol e acetato de amônio. Após a preparação, as fases móveis foram filtradas através de membrana de filtro hidrofílico Durapore[®] PVDF 0,45 μ m de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, USA) e degaseificadas em ultra-som por 20 minutos antes de serem usadas.

O sistema cromatográfico foi lavado durante 60 minutos com a fase móvel antes de se dar início às injeções a fim de equilibrar-se a coluna quiral e estabilizar-se o sistema.

5.2.2.6 PREPARAÇÃO DAS FASES MÓVEIS PARA A COLUNA WHELK-O 1[®]

As separações enantioméricas dos antiinflamatórios não-esteróides foram obtidas empregando CLAE-FEQ em modo normal. As fases foram constituídas de hexano, juntamente com o modificador orgânico como etanol ou isopropanol. O ácido acético em pequena quantidade foi utilizado para melhorar a simetria dos picos. Após a preparação, as fases móveis foram filtradas através de membrana de filtro hidrofóbica, 0,45 μ m, Millipore[®] GVHP 0,45 μ m de porosidade, diâmetro de 47mm (Millipore corporation, MA, USA) e degaseificadas em ultra-som por 20 minutos antes de serem utilizadas.

5.2.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SELECIONADO PARA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO ATENOLOL

Visando a padronização do método, foram fixados os seguintes parâmetros:

Coluna cromatográfica - Chiralcel OD[®] (10 μ m), medindo 250 x 4.6 mm;

Fase móvel - hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v);

Vazão da fase móvel - 1,0 mL/min.;

Deteção - ultravioleta em 276nm;

Temperatura - ambiente (24°C $\pm$ 2);

5.2.3.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração do (R)-atenolol e do (S)-atenolol foram construídas a partir de soluções mãe, em etanol, de cada um dos isômeros, separadamente.

Foram pesados com exatidão 20,00 mg de padrão R-atenolol, que foram transferidos para balão volumétrico de 50mL e em seguida adicionados 45mL de etanol. O balão foi submetido ao ultra-som por 10 min a fim de solubilizar o soluto. Em seguida completou-se o volume com etanol.

Uma alíquota de 25,0 mL desta solução, contendo 400,0 μ g/mL de R-atenolol, foi transferida para balão volumétrico de 50mL e o volume foi completado com fase móvel. Dessa solução, foram transferidas nove alíquotas, cujos volumes variaram de 2,5 a 6,5mL, para balões volumétricos de 10mL. Os volumes dos balões foram completados com a fase móvel, obtendo-se soluções com intervalo de concentração variável de 50,00 a 130,00 μ g de R-atenolol /mL.

Foram injetados 20 μ L de cada solução, em triplicata. A curva foi construída traçando-se a área média das três injeções contra a concentração em cada nível, calculando-se a estimativa do erro padrão e o coeficiente de correlação de Pearson. Os cálculos das retas foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados. Procedimento similar foi efetuado para obter-se a curva padrão do S-atenolol.

5.2.3.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS (R)- E (S)- ATENOLOL EM COMPRIMIDOS

5.2.3.2.1 PESQUISA DE INTERFERENTES DOS EXCIPIENTES A PARTIR DOS PLACEBOS

Com o objetivo de averiguar-se as possíveis interferências dos excipientes no método propostos, foram analisados os placebos das amostras comerciais estudadas.

5.2.3.2.2 PREPARAÇÃO DOS PLACEBOS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D

Foram utilizados dois tipos de placebos para o teste de interferentes. A primeira amostra de placebo foi fornecida por uma indústria farmacêutica (a) e a segunda amostra de placebo foi preparada no laboratório (b). Utilizaram-se quantidades de excipientes comumente empregadas na fabricação de comprimidos e em quantidades similares às da amostra farmacêutica comercial. Foram pesadas quantidades de placebo equivalentes a 100,0 mg do atenolol e transferidas para balões volumétricos de 100mL. Foram adicionados aproximadamente 90mL de etanol e procedeu-se a solubilização em banho de ultra-som por 10 minutos. Os volumes foram completados com etanol e as soluções filtradas através de Whatmann N^o 1, desprezando-se os primeiros 5mL. Dessas soluções, foram transferidas alíquotas de 5,0 mL para balões volumétricos de 25mL, completando-se os volumes com a fase móvel.

Foram efetuadas três determinações de cada placebo e de cada solução padrão injetando-se 20µl de cada solução em triplicata. Todas as soluções foram filtradas através da unidade filtrante HV Millex[®], com membrana Durapore[®], 0,45µm, 13mm, antes de serem injetadas.

5.2.3.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO ATRAVÉS DA REPETIBILIDADE (“INTER-DIA”)

5.2.3.3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE R-ATENOLOL (100,0 µg/mL) E DE S-ATENOLOL (100,0 µg/mL)

Foram pesados com exatidão 20,00 mg de R-atenolol padrão e transferidos para balão volumétrico de 50mL. Após a adição de 45mL de etanol a mistura foi submetida ao banho de ultra-som por 10 min a fim de solubilizar o soluto. Completou-se o volume com etanol. Transferiu-se uma alíquota de 25mL desta solução contendo 400,0 µg/mL de R-atenolol para balão de 100mL e completou-se o volume com fase móvel. A solução final contém 100,0 µg de R-atenolol / mL. A solução padrão contendo 100,0 µg de S-atenolol / mL foi obtida seguindo-se o mesmo procedimento.

5.2.3.3.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D

Foram pesados separadamente 20 comprimidos contendo 100,0 mg do atenolol cada um e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados e o pó misturado. Foram pesadas quantidades de pó equivalentes a 100,0 mg do atenolol base livre e transferidas para balões volumétricos de 100mL. Foram adicionados aproximadamente 90mL de etanol e procedeu-se a solubilização em banho de ultra-som por 10 minutos. Os volumes foram completados com etanol e as soluções filtradas através de papel Whatmann nº1, desprezando-se os primeiros 5,0 mL. Dessas soluções, foram transferidas aliquotas de 10,0 mL para balões volumétricos de 50mL, completando-se os volumes com a fase móvel. A solução final contém 200,0 µg de (R, S)-atenolol / mL.

Foram efetuadas dez determinações de cada amostra e três das soluções padrão injetando-se no cromatógrafo 20µl de cada solução. Os resultados foram analisados estatisticamente. Todas as soluções foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex®, membrana Durapore®, 0,45µm, 13mm, antes de serem injetadas.

5.2.3.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação é efetuado para comprovar-se a exatidão do método. O teste envolve adição de uma quantidade conhecida de padrão à amostra, seguida da determinação através de método proposto. Normalmente o teste é efetuado em mais de um nível de concentração para se ter maior segurança.

5.2.3.4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE (R, S)-ATENOLOL (500,0 µg/mL)

Foram pesados, com exatidão, 25,00 mg de R-atenolol padrão e 25,00 mg de S-atenolol padrão que foram transferidos para balão volumétrico de 50mL. Adicionaram 45mL de etanol ao balão. A mistura foi submetida ao banho de ultra-som por 10 min a fim de solubilizar o soluto e em seguida o volume foi completado com etanol. Dessa solução, foi transferida uma alíquota de 25,0 mL para balão volumétrica de 50mL e o volume foi completado com a fase móvel. Esta solução contém 250,0 µg/mL de R-atenolol e 250,0 µg/mL de S-atenolol ou 500,0 µg/mL de (R, S)-atenolol, com ambos enantiômeros em proporções iguais.

5.2.3.4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D

Foram pesados separadamente 20 comprimidos contendo 100,0 mg do atenolol cada um e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados e o pó misturado. Foram pesadas quantidades de pó equivalentes a 100,0 mg do atenolol base livre e transferidas para balões volumétricos de 100mL. Foram adicionados aproximadamente 90mL de etanol e procedeu-se à solubilização em banho de ultra-som por 10 minutos. Os volumes foram completados com etanol e as soluções filtradas através de papel Whatmann nº1, desprezando-se os primeiros 5,0 mL.

Dessas soluções, foram transferidas alíquotas de 25,0 mL para balões volumétricos de 50mL, completando-se os volumes com a fase móvel. A solução final contém 500,0 µg de (R, S)-atenolol /mL. Todas as soluções foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex®, membrana Durapore®, 0,45µm, 13mm, antes de serem injetadas.

5.2.3.4.3 PROCEDIMENTO

Foram transferidas alíquotas das amostras e da solução padrão para balões volumétricos de 10mL, conforme indicado na Tabela 20. Os volumes dos balões foram completados com a fase móvel. Os testes foram efetuados em três níveis de concentração (80-120% de concentração média), com injeções em triplicata, em cada nível ^(100, 101). Todas as soluções foram preparadas de tal forma que as concentrações das soluções injetadas estivessem sempre dentro da faixa de concentração da curva padrão ^(11, 100, 101, 182).

A porcentagem de recuperação foi calculada seguindo-se as recomendações da “Association of Official Analytical Chemists International”(AOAC INTERNATIONAL) ⁽¹¹⁾ e International Conference on Harmonization (ICH) ^(100, 101).

TABELA 20. ESQUEMA PARA A OBTENÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA O TESTE DE RECUPERAÇÃO

Balão volumétrico	Volume da solução da amostra (A, B, C e D) (500,0 µg/mL) (Racêmico)	Volume adicionado de padrão (500,0 µg/mL) (Racêmico)
1	2,0 mL	-----
2	2,0 mL	2,0 mL
3	2,0 mL	2,5 mL
4	2,0 mL	3,0 mL
5	-----	2,0 mL

Os volumes foram completados com a fase móvel e 20µL de cada solução foram injetados no cromatógrafo líquido, após filtração adequada das soluções

5.2.3.4.3.1 CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA DE PADRÃO

A porcentagem recuperada do padrão (R%) foi calculada pela equação 1

$$\%R = \frac{C_f - C_{nf}}{C_p} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

% R → Porcentagem do padrão recuperada

C_f → Concentração do R-metoprolol ou S-metoprolol “fortificada” com padrão,

C_{nf} → Concentração do R-metoprolol ou S-metoprolol “não fortificada” com padrão (concentração de R-metoprolol ou S-metoprolol na amostra sem adição do padrão),

C_p → Concentração do padrão R-metoprolol ou S-metoprolol usado para “fortificar” a amostra.

5.2.3.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DO R- ATENOLOL E DO S- ATENOLOL

5.2.3.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO

Determinou-se limite de detecção através da análise da solução da amostra contendo 200,0 µg/mL do atenolol racêmico. Cada amostra foi analisada dez vezes consecutivas, calculando-se os desvios padrão entre os resultados de R-atenolol e S-atenolol separadamente. Calculou-se a média dos desvios padrão e dividiu-se o desvio padrão médio pela inclinação da curva de calibração (I) para obter-se a estimativa do ruído associado ao método de ensaio. O valor do ruído multiplicado pelo fator 3 foi utilizado para estimar o limite de detecção (LD), que é expresso em unidade de concentração ^(25, 100, 101).

$$LD = 3 \times \frac{DP}{I} \quad (\text{Equação 2})$$

5.2.3.5.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação foi determinado através da análise da solução da amostra contendo 200,0 µg/mL do atenolol racêmico. Cada amostra foi analisada dez vezes consecutivas, calculando-se o desvio padrão entre os resultados do R-atenolol e do S-atenolol, separadamente. Calculou-se então a média dos desvios padrão e dividiu-se o desvio padrão médio pela inclinação da curva de calibração (I), obtendo-se assim a estimativa do ruído associado ao método de análise. O valor do ruído multiplicado pelo fator 10 foi utilizado para estimar o limite de quantificação (LQ), que é expresso em unidade de concentração ^(25, 100, 101).

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{I} \quad (\text{Equação 3})$$

Tanto o LD quanto o LQ são parâmetros necessários quando se trata da determinação e quantificação enantiomérica de fármacos quirais, especialmente em amostras biológicas e no controle de qualidade destes fármacos em medicamentos.

5.2.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SELECIONADO PARA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO METOPROLOL

Visando a padronização do método, foram fixados os seguintes parâmetros:

Coluna cromatográfica - Chiralcel OD® (10µm, medindo 250 x 4.6mm);

Fase móvel - hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v);

Vazão da fase móvel - 0,8 mL/min.;

Deteção - ultravioleta em 276nm;

Temperatura - ambiente (24°C ± 2);

5.2.4.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração do (R)-metoprolol e do (S)-metoprolol foram construídas a partir de soluções em etanol de cada um dos isômeros, separadamente. Foram pesados com exatidão 20,00 mg de R-metoprolol (base livre) padrão e transferidos para balão volumétrico de 50mL. Após adição de 45mL de etanol, a mistura foi submetida ao ultrassom por 10 min a fim de solubilizar o soluto. O volume foi completado com etanol.

Uma alíquota de 25,0 mL desta solução, contendo 400,0 µg/mL de R-metoprolol, foi transferida para balão volumétrico de 50mL. O volume foi completado com fase móvel. Dessa solução foram transferidas nove alíquotas, cujos volumes variaram de 1,5 a 5,5mL, para balões volumétricos de 10mL. Os volumes dos balões foram completados com a fase móvel, obtendo-se soluções com intervalo de concentração variável entre 30,00 e 110,0 µg de R-metoprolol / mL.

Foram injetados no cromatógrafo 20µL de cada solução, em triplicata. A curva foi construída traçando-se a área média das três injeções versus a concentração em cada nível. Foram calculados a estimativa do erro padrão e o coeficiente de correlação de Pearson. Os cálculos das retas foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados. Procedimento similar foi seguido para obter-se a curva padrão do S-metoprolol.

5.2.4.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS (R)- E (S)- METOPROLOL EM COMPRIMIDOS

5.2.4.2.1 PESQUISA DE INTERFERENTES DOS EXCIPIENTES A PARTIR DOS PLACEBOS

Com o objetivo de averiguar-se a possível interferência dos excipientes no método proposto foram analisada os placebos da amostra comercial estudada.

5.2.4.2.2 PREPARAÇÃO DO PLACEBO DA AMOSTRA COMERCIAL E

Seguiu-se o mesmo procedimento já descrito no item 5.2.3.2.2

Foram efetuadas três determinações de cada placebo e das soluções padrão injetando-se no cromatógrafo 20µl de cada solução. Todas as soluções foram filtradas na unidade filtrante HV Millex[®], membrana Durapore[®], 0,45µm, 13mm, antes de serem injetadas.

5.2.4.3 AVALIAÇÃO DA PRECISÃO ATRAVÉS DA REPETIBILIDADE (“INTER-DIA”)

5.2.4.3.1 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE R-METOPROLOL (100,0 µg/mL) E DE S-METOPROLOL (100,0 µg/mL)

Foram pesados com exatidão 20,00 mg de R-metoprolol (base livre) padrão e transferidos para balão volumétrico de 50mL. Após a adição de 45mL de etanol, a mistura foi submetida ao banho de ultra-som por 10 min a fim de solubilizar o soluto. O volume foi completado com etanol. Uma alíquota de 5,0 mL desta solução contendo 400,0 µg/mL de R-metoprolol, foi transferida para balão de 25mL. O volume foi completado com fase móvel. A solução final contém 80,00 µg de R-metoprolol /mL. A solução padrão contendo 80,00 µg de S-metoprolol /mL foi obtida seguindo-se o mesmo procedimento.

5.2.4.3.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL E

Foram pesados separadamente 20 comprimidos contendo 100,0 mg de metoprolol cada um. Determinou-se o peso médio. Após a trituração dos comprimidos, pesou-se uma quantidade de pó equivalente a 100,0 mg do metoprolol (base livre) e transferiu-se para balão volumétrico de 100mL. Após a adição de aproximadamente 90mL de etanol, a mistura foi agitada em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com etanol e a solução filtrada através de papel Whatmann nº1, desprezando-se os primeiros 5,0 mL. Uma alíquota de 20,0 mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50mL e o volume completado com a fase móvel. Dessa solução, foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 25mL, completando-se o volume com a fase móvel. A solução final contém 160,0 µg de (R, S)-metoprolol /mL.

Foram efetuadas dez determinações da amostra e três determinações da solução padrão, injetando-se no cromatógrafo 20µL de cada solução. Os resultados foram analisados estatisticamente. Todas as soluções foram filtradas na unidade filtrante HV Millex®, membrana Durapore®, 0,45µm, 13mm, antes de serem injetadas.

5.2.4.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação é efetuado para comprovar-se a exatidão do método. Consiste em adicionar à amostra quantidades conhecidas da substância padrão, empregando-se em seguida o método proposto de análise.

5.2.4.4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE (R, S)-METOPROLOL (400,0 $\mu\text{g/mL}$)

Foram pesados com exatidão 20,00 mg de R-metoprolol (base livre) padrão e transferidos para balão volumétrico de 50mL. Em seguida adicionou-se 45mL de etanol. A mistura foi submetida ao banho de ultra-som por 10 min a fim de solubilizar o soluto. O volume foi completado com etanol. Esta solução contém 400,0 μg de R-metoprolol /mL. A solução padrão contendo 400,0 μg de S-metoprolol /mL foi obtida seguindo-se o mesmo procedimento. Aliquotas de 12,5 mL das soluções obtidas foram transferidas para balão de 25mL, completou-se o volume com fase móvel e obteve-se uma solução contendo 400,0 μg de (R, S)-metoprolol (base livre) /mL.

5.2.4.4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL E

Foram pesados individualmente 20 comprimidos contendo 100,0 mg do metoprolol cada um e em seguida determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados até pó. Pesou-se uma quantidade do pó equivalente a 100,0 mg de (R, S)-metoprolol (base livre) e transferiu-se para balão volumétrico de 100mL. Após a adição de aproximadamente 90mL de etanol a mistura foi submetida ao banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi completado com etanol e a solução filtrada através de papel Whatmann nº1, desprezando-se os primeiros 5,0 mL. Dessa solução, foram transferidas aliquotas de 20,0 mL para balões volumétricos de 50mL, completando-se os volumes com a fase móvel. A solução final contém 400,0 µg de (R, S)-metoprolol /mL. Todas as soluções foram filtradas em unidade filtrante HV Millex[®], membrana Durapore[®], 0,45µm, 13mm, antes de serem injetadas.

5.2.4.4.3 PROCEDIMENTO

Foram transferidas aliquotas da amostra e da solução padrão para balões volumétricos de 10mL, conforme apresentado na Tabela 21. Os volumes dos balões foram completados com a fase móvel. Os testes foram efetuados em três níveis de concentração (80-120% da concentração média), com injeções em triplicata em cada nível ^(101, 175). Todas as soluções foram preparadas de tal forma que as concentrações injetadas caíssem sempre na faixa da curva padrão obtida.

A porcentagem de recuperação foi calculada seguindo-se as recomendações da "Association of Official Analytical Chemists International"(AOAC INTERNATIONAL) ⁽¹¹⁾ e da "International Conference on Harmonization" (ICH) ^(100, 101).

TABELA 21. DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUMES DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS E DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE RECUPERAÇÃO

Balão volumétrico	Volume da solução da amostra (E) (400,0 µg/mL) (Racêmico)	Volume adicionado de padrão (400,0 µg/mL) (Racêmico)
1	2,0 mL	-----
2	2,0 mL	2,0 mL
3	2,0 mL	2,5 mL
4	2,0 mL	3,0 mL
5	-----	2,0 mL

Os volumes foram completados com a fase móvel e 20µL de cada solução foram injetados no cromatógrafo líquido, após filtração adequada das soluções.

5.2.4.4.3.1 CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA DE PADRÃO

A porcentagem recuperada do padrão (R%) foi calculada pela equação 1

$$\%R = \frac{C_f - C_{nf}}{C_p} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

% R → Porcentagem do padrão recuperada

C_f → Concentração do R-metoprolol ou S-metoprolol “fortificada” com padrão,

C_{nf} → Concentração do R-metoprolol ou S-metoprolol “não fortificada” com padrão (concentração de R-metoprolol ou S-metoprolol na amostra sem adição do padrão),

C_p → Concentração do padrão R-metoprolol ou S-metoprolol usado para “fortificar” a amostra.

5.2.4.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DO R- METOPROLOL E DO S- METOPROLOL

5.2.4.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO

Determinou-se limite de detecção através da análise da solução da amostra contendo 160,0 µg/mL do metoprolol racêmico. Para tanto, seguiu-se o procedimento descrito no item 5.2.3.5.1

5.2.4.5.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Determinou-se limite de quantificação através da análise da solução da amostra contendo 160,0 µg/mL do metoprolol racêmico. O procedimento foi o mesmo já descrito no item 5.2.3.5.2

5.2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO SELECIONADO PARA DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO FLURBIPROFENO

Visando a padronização do método, foram fixados os seguintes parâmetros:

Coluna cromatográfica – Whelk-O 1[®] (10 μ m, medindo 250 x 4.6mm);

Fase móvel - hexano:etanol:ácido acético (95:5:0,2 v/v/v);

Vazão da fase móvel - 0,9 mL/min.;

Deteção - ultravioleta em 246nm;

Temperatura controlada em 24°C $\pm$ 1;

Volume injetado - 20 μ L;

Sistema II de cromatografia líquida – Shimadzu.

5.2.5.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE S-FLURBIPROFENO

A curva de calibração de S-flurbiprofeno foi construída injetando-se nove concentrações diferentes do isômero, que variaram de 2,0-18,0 μ g/mL.

A solução inicial foi preparada transferindo-se exatamente 20,00mg de S-flurbiprofeno para balão de 50mL. Foram adicionados aproximadamente 45mL de etanol, grau cromatográfico, e em seguida a solução foi submetida à banho em ultrassom durante 10min. O volume foi completado com o mesmo solvente de modo a obter-se uma solução contendo 400,0 μ g/mL de S-flurbiprofeno. Uma alíquota de 10,0mL desta solução foi transferida, para balão volumétrico de 100mL, completando-se o volume com fase móvel para a obtenção de solução contendo 40,00 μ g/mL de S-flurbiprofeno.

Uma série de alíquotas desta solução, com volumes crescentes, foi transferida para nove balões volumétricos de 10mL e os volumes finais completados com a fase móvel (Tabela 22). Cada uma destas soluções foi injetada em duplicata. A curva de calibração foi obtida relacionando-se as áreas médias e as concentrações correspondentes.

TABELA 22. PREPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DE SOLUÇÃO CONTENDO 40,00 μ g/mL DE S-FLURBIPROFENO (S-FLU) PARA OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

No. DO BALÃO	VOL. DE SOLUÇÃO (S-FLU)	VOL. FINAL COMPLETADO COM FASE MÓVEL	CONCENTRAÇÃO S-FLU (μ g/mL)*
1	0,5	10mL	2,000
2	1,0	10mL	4,000
3	1,5	10mL	6,000
4	2,0	10mL	8,000
5	2,5	10mL	10,00
6	3,0	10mL	12,00
7	3,5	10mL	14,00
8	4,0	10mL	16,00
9	4,5	10mL	18,00

* 20 μ L destas soluções foram injetadas no sistema, em duplicata

Foram injetados no cromatógrafo 20 μ L de cada solução, em duplicata. A curva foi construída traçando-se a área média das duas injeções versus a concentração em cada nível. Foram calculados a estimativa do erro padrão e o coeficiente de correlação de Pearson. Os cálculos das retas foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados.

5.2.5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DO ISÔMERO (S)- FLURBIPROFENO EM AMOSTRA COMERCIAL

5.2.5.3 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO ATRAVÉS DA REPETIBILIDADE (“INTER-DIA”)

5.2.5.3.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA TESTE DE REPRODUTIBILIDADE

Uma quantidade exatamente equivalente a 20,00mg de (R/S)-flurbiprofeno foi pesada e transferida para balão volumétrico de 50mL. Adicionou-se cerca de 45,0mL de etanol ao balão submetendo-o em seguida ao banho de ultrassom por 10 minutos. Finalmente, completou-se o volume do balão com o mesmo solvente obtendo-se a solução inicial na concentração de 400,0µg/mL do flurbiprofeno racêmico. Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50mL. Completou-se o volume com fase móvel. A partir desta solução, por diluições, foram obtidas soluções contendo 8,000 e 20,00µg/mL de (R/S)-flurbiprofeno.

5.2.5.3.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL F PARA TESTE DE REPRODUTIBILIDADE

O conteúdo de vinte cápsulas foi pesado separadamente e o peso médio foi determinado. O conteúdo das cápsulas foi triturado em gral e homogeneizado. Uma quantidade, equivalente a 200,0mg de flurbiprofeno racêmico foi transferida para balão volumétrico de 100mL, onde foi adicionado um volume de aproximadamente 90,0mL de etanol. Em seguida, submeteu-se a solução ao banho em ultrassom por 10 minutos com a finalidade de solubilizar o fármaco no meio solvente. Completou-se o volume com o mesmo solvente misturando-se manualmente para homogeneização. Esta solução foi filtrada empregando-se papel de filtro Whatman n°. 1.

Uma alíquota de 10,0mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 50mL, e o volume completado com etanol. Obteve-se assim uma solução de concentração igual a 400,0µg/mL de (R/S)-flurbiprofeno. Transferiu-se uma alíquota de 5,0mL, desta solução para balão volumétrico de 50mL. O volume final foi completado com fase móvel, resultando numa solução de concentração igual a 40,00µg/mL. A partir desta última, diluições foram realizadas a fim de obter-se soluções com concentrações finais de 8,000 e 20,00µg/mL do fármaco racêmico.

As soluções finais da amostra e do padrão de concentração 8,000 e 20,00µg/mL foram filtradas em filtro de membrana HV Millex, Durapore®, 0.45µm, 13mm, antes de serem injetadas no cromatógrafo. Foram injetados 20µL de cada solução no sistema cromatográfico, sendo que para a solução da amostra o procedimento foi realizado dez vezes e para a solução padrão em triplicata.

5.2.5.4 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO

O teste de recuperação é efetuado para comprovar-se a exatidão do método. Consiste em adicionar à amostra quantidades conhecidas da substância padrão, empregando-se em seguida o método proposto de análise.

5.2.5.4.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE (R, S)-FLURBIPROFENO (40,00 µg/mL)

Uma solução contendo 40,00µg/mL de (R/S)-flurbiprofeno foi obtida segundo descrito na obtenção de solução padrão para teste de reprodutibilidade (precisão). A concentração final desta solução foi 40,00µg/mL de flurbiprofeno racêmico.

5.2.5.4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL F

As soluções padrão e a solução da amostra contendo 40,00 µg/mL do flurbiprofeno racêmico foram obtidas, separadamente, como descrito anteriormente para a preparação da solução padrão e da solução da amostra para teste de precisão. A exatidão do método foi determinada através da análise de recuperação de uma quantidade de padrão conhecida adicionada à solução da amostra. Em outras palavras, a exatidão deste método foi determinada pelo grau de concordância entre a concentração do flurbiprofeno determinado na solução da amostra fortificada (amostra “spiked”), não fortificada, e na concentração teórica conhecida de padrão adicionado à amostra. Fortificou-se a amostra com o padrão em três níveis de concentração, de tal forma que a concentração final destas soluções abrangesse nível baixo, médio e alto da curva padrão ⁽⁵²⁾. Recomenda-se que os resultados dos testes de recuperação estejam entre 80-120% de concentração média da curva padrão (100, 101, 105, 106). Todas as soluções preparadas para o teste de recuperação foram injetadas em triplicata. O esquema da diluição e da preparação das soluções para o teste de recuperação pode ser visto na Tabela 23.

A porcentagem de recuperação foi calculada seguindo-se as recomendações da “Association of Official Analytical Chemists International”(AOAC INTERNATIONAL) ⁽¹¹⁾ e da “International Conference on Harmonization” (ICH) ^(100, 101).

TABELA 23. DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUMES DAS SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS E DA SOLUÇÃO PADRÃO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE RECUPERAÇÃO

Balão volumétrico	Volume da solução da amostra (F) (40,00 µg/mL) (Racêmico)	Volume adicionado de padrão (40,00 µg/mL) (Racêmico)
1	2,0 mL	-----
2	2,0 mL	2,0 mL
3	2,0 mL	2,5 mL
4	2,0 mL	3,0 mL
5	-----	3,0 mL

Os volumes foram completados com a fase móvel e 20 µL de cada solução foram injetados no cromatógrafo líquido, após filtração adequada das soluções

5.2.5.4.3.1 CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA DE PADRÃO

A porcentagem recuperada do padrão (R%) foi calculada pela equação 1

$$\%R = \frac{C_f - C_{nf}}{C_p} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

% R → Porcentagem do padrão recuperada

C_f → Concentração do R-flurbiprofeno ou S-flurbiprofeno “fortificada” com padrão,

C_{nf} → Concentração do R-flurbiprofeno ou S-flurbiprofeno “não fortificada” com padrão (concentração de R-flurbiprofeno ou S-flurbiprofeno na amostra sem adição do padrão),

C_p → Concentração do padrão R-flurbiprofeno ou S-flurbiprofeno usado para “fortificar” a amostra.

5.2.5.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DO S-FLURBIPROFENO

5.2.5.5.1 LIMITE DE DETECÇÃO

Determinou-se limite de detecção através da análise da solução da amostra em dois níveis de concentração (8,000µg/mL e 20,00µg/mL). Cada amostra foi analisada dez vezes consecutivas, sendo calculado o desvio padrão entre os resultados de R-flurbiprofeno e S-flurbiprofeno separadamente. Calculou-se a média dos desvios padrão e dividiu-se o desvio padrão médio pela inclinação da curva de calibração (I) para obter-se a estimativa do ruído associado ao método de ensaio. O valor do ruído multiplicado pelo fator 3 foi utilizado para estimar o limite de detecção (LD), que é expresso em unidade de concentração ^(25, 100, 101).

$$LD = 3 \times \frac{DP}{I} \dots\dots\dots \text{Equação 2}$$

5.2.5.5.2 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação foi determinado através da análise da solução da amostra em dois níveis de concentração (8,000µg/mL e 20,00µg/mL). Cada amostra foi analisada dez vezes consecutivas, calculando-se o desvio padrão entre os resultados de R-flurbiprofeno e S-flurbiprofeno separadamente. Calculou-se então a média dos desvios padrão e dividiu-se o desvio padrão médio pela inclinação da curva de calibração (I) para obter-se a estimativa do ruído associado ao método de análise. O valor do ruído multiplicado pelo fator 10 foi utilizado para estimar o limite de quantificação (LQ), que é expresso em unidade de concentração ^(25, 100, 101).

$$LQ = 10 \times \frac{DP}{I} \dots\dots\dots \text{Equação 3}$$

6. RESULTADOS

6.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO

FIGURA 18. Espectro de absorção no UV do metoprolol (80,00 $\mu\text{g/mL}$) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

FIGURA 19 Espectro de absorção no UV do betaxolol (80,00 µg/mL) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

FIGURA 20. Espectro de absorção no UV do pindolol (80,00 µg/mL) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

FIGURA 21. Espectro de absorção do atenolol 80,00 µg/mL em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

FIGURA 22. Espectro de absorção no UV do nadolol (80,00 µg/mL) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

FIGURA 23. Espectro de absorção no UV do ibuprofeno (16,00 µg/mL) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

FIGURA 24. Espectro de absorção no UV do flurbiprofeno (16,00 µg/mL) em hexano:isopropanol (70:30 v/v)

6.2.1 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO METOPROLOL

TABELA 24. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO METOPROLOL

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol (70:30 v/v)	276	0,7	0,5	0,50	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M1
Hexano:isopropanol (70:30 v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M2
Hexano:isopropanol (70:30 v/v)	225	1,0	4,0	0,50	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M3
Hexano:etanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	276	1,0	0,5	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M4
Hexano:etanol:dietilamina (85:15:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M5
Hexano:isopropanol:dietilamina (75:25:0,1 v/v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M6
Hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,50	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M7
Hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	276	1,0	0,5	1,00	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M8
Hexano:isopropanol:dietilamina (65:35:0,1 v/v/v)	276	1,0	0,5	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M9
Hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M10

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,2 v/v/v)	276	1,0	0,50	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M11
Hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,2 v/v/v)	276	0,8	0,50	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M12
Hexano:etanol:dietilamina (90:10:0,2 v/v/v)	276	1,0	0,50	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M13
Hexano:etanol:dietilamina (90:10:0,2 v/v/v)	276	0,5	0,50	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M14
Hexano:etanol:dietilamina (95:05:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,00	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M15
Hexano:etanol:dietilamina (95:05:0,2 v/v/v)	276	1,0	1,00	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M16
Hexano:etanol:dietilamina (98:02:0,2 v/v/v)	276	1,0	0,50	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M17
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,1 v/v/v/v)	276	1,0	1,00	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	M18
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,00	0,25	$\pm 80,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M19
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	0,8	2,00	0,25	$\pm 160,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	M20

Volume injetado (20 μL)

Cont....

Cont....

Cromatograma M11

Cromatograma M12

Cromatograma M13

Cromatograma M14

Cromatograma M15

Cromatograma M16

Cont....

Cromatograma M17

Cromatograma M18

Cromatograma M19

Cromatograma M20

CROMATOGRAMAS (Tabela 24) – Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do metoprolol em diferentes condições

6.2.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ATENOLOL

TABELA 25. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ATENOLOL

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol (70:30 v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 160,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	A1
Hexano:isopropanol: dietilamina (60:40:0,1 v/v/v)	276	0,5	0,5	0,50	$\pm 1000,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	A2
Hexano:isopropanol (60:40 v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 400,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	A3
Hexano:isopropanol (50:50 v/v)	276	0,7	1,0	0,25	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A4
Hexano:etanol: dietilamina (90:10:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A5
Hexano:etanol: dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,50	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A6
Hexano:etanol: dietilamina (75:25:0,1 v/v/v)	276	0,7	1,0	0,25	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A7
Hexano:etanol: dietilamina (75:25:0,1 v/v/v)	276	0,5	1,0	0,25	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A8
Hexano:etanol: dietilamina (75:25:0,2 v/v/v)	276	0,7	1,0	0,25	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A9
Hexano:etanol: dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 400,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A10
Hexano:etanol: dietilamina (70:30:0,2 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 1000,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	A11
Hexano:etanol: dietilamina (60:40:0,1 v/v/v)	276	1,0	4,0	0,25	$\pm 1000,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	A12

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:etanol:dietilamina (60:40:0,2 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,02	Chiralcel OD [®]	A13
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,02	Chiralcel OD [®]	A14
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,02	Chiralcel OD [®]	A15
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	R- 200,0	0,02	Chiralcel OD [®]	A16
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	S- 200,0	0,02	Chiralcel OD [®]	A17
Hexano:etanol:dietilamina:CF ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,05	Chiralcel OD [®]	A18
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (60:40:0,2:0,2 v/v/v)	220	1,0	4,4	0,25	$\pm$ 400,0	0,05	Chiralcel OD [®]	A19
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (60:40:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,02	Chiralcel OD [®]	A20
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (60:40:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	Fase móvel	0,02	Chiralcel OD [®]	A21
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (60:40:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	Placebo a	0,02	Chiralcel OD [®]	A22
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (60:40:0,2:0,2 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	Placebo b	0,02	Chiralcel OD [®]	A23

Volume injetado (20 μL)

Placebo a : amostra placebo fornecido pela industria farmacêutica

Placebo b : amostra preparada no laboratório, misturando-se os excipientes (mais detalhes no texto)

Cont....

Cromatograma A7

Cromatograma A8

Cromatograma A9

Cromatograma A10

Cromatograma A11

Cromatograma A12

Cont....

Cromatograma A13

Cromatograma A14

Cromatograma A15

Cromatograma A16

Cromatograma A17

Cromatograma A18

Cont....

Cromatograma A19

Cromatograma A20

Cromatograma A21

Cromatograma A22

Cromatograma A23

CROMATOGRAMAS (Tabela 25) – Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do atenolol em diferentes condições.

6.2.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO PINDOLOL

TABELA 26. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO PINDOLOL

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol (70:30 v/v)	276	1,0	0,5	0,25	$\pm 160,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	P1
Hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,2 v/v/v)	276	0,9	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	P2
Hexano:isopropanol:dietilamina (60:40:0,1 v/v/v)	276	0,7	2,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	P3
Hexano:isopropanol:etanol:dietilamina (80:10:10:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	P4
Hexano:etanol:dietilamina (95:5:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	P5
Hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	254	1,0	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	P6
Hexano:etanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	254	1,0	0,5	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	P8
Hexano:etanol:dietilamina (70:30:0,3 v/v/v)	254	1,0	2,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	P9
Hexano:etanol:dietilamina (70:30:0,3 v/v/v)	276	1,0	2,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	P10
Hexano:isopropanol:dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,2 v/v/v/v)	254	1,0	4,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	P11

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromato grama
Hexano:isopropanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v/v)	254	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,02	Chiralcel OD®	P12
Hexano:isopropanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,02	Chiralcel OD®	P13
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v)	254	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,02	Chiralcel OD®	P14
Diclorometano:etanol; (act. am. 20 mM) (85:15 v/v)	254	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,05	α -Burke 2®	P15
Diclorometano:etanol; (act. am. 20 mM) (80:20 v/v)	254	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,05	α -Burke 2®	P16
Diclorometano:etanol (80:20 v/v)	254	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,05	α -Burke 2®	P17
Acetonitrila:etanol (act. am. 20 mM) (85:15 v/v)	220	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,20	α -Burke 2®	P18
Acetonitrila:etanol (act. am. 13 mM) (70:30 v/v)	220	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,20	α -Burke 2®	P19
Acetonitrila:etanol (act. am. 21,62 mM) (60:240 v/v)	220	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2®	P20
Acetonitrila:etanol (act. am. 21,62 mM) (50:50 v/v)	220	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,20	α -Burke 2®	P21
Acetonitrila:etanol (act. am. 21,62 mM) (50:50 v/v)	220	1,3	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,20	α -Burke 2®	P22
Acetonitrila:etanol (act. am. 21,62 mM) (50:50 v/v)	220	0,8	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,20	α -Burke 2®	P23

Volume injetado (20 μL)

act. am. = acetato de amônio

Cont....

Cromatograma P8

Cromatograma P9

Cromatograma P10

Cromatograma P11

Cromatograma P12

Cromatograma P13

Cont....

Cromatograma P14

Cromatograma P15

Cromatograma P16

Cromatograma P17

Cromatograma P18

Cromatograma P19

Cont. .

Cromatograma P20

Cromatograma P21

Cromatograma P22

Cromatograma P23

CROMATOGRAMAS (Tabela 26) – Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do pindolol em diferentes condições.

6.2.4 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO BETAXOLOL

TABELA 27. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO BETAXOLOL

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 160,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	B1
Hexano:isopropanol: dietilamina (60:40:0,1 v/v/v/)	276	0,7	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	B2
Hexano:isopropanol:etanol: dietilamina (80:10:10:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	B3
Hexano:etanol: dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	B4
Hexano:etanol: dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	B5

Volume injetado (20 μL)

CROMATOGRAMAS (Tabela 27) – Ensaio preliminar para a separação enantiomérica do betaxolol em diferentes condições

6.2.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO NADOLOL

TABELA 28. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO NADOLOL

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol (70:30 v/v)	276	1,0	0,5	0,50	$\pm 400,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	N1
Hexano:isopropanol:dietilamina (60:40:0,1 v/v/v)	276	0,7	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	N2
Hexano:isopropanol:etanol:dietilamina (80:10:10:0,1 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,01	Chiralcel OD [®]	N3
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (70:30:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N4
Hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N5
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N6
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,3 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N7
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (80:20:0,3:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N8
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (85:15:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N9
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (85:15:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	0,7	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	N10

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromato grama
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (85:15:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	0,8	1,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,02	Chiralcel OD [®]	N11
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (87:13:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	0,8	1,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,02	Chiralcel OD [®]	N12
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (90:10:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	0,8	1,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,02	Chiralcel OD [®]	N13
Hexano:etanol:dietilamina:CH ₃ COOH (90:10:0,2:0,2 v/v/v/v)	276	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 400,0	0,02	Chiralcel OD [®]	N14

Volume injetado (20 μL)

Cromatograma N1

Cromatograma N2

Cromatograma N3

Cromatograma N4

Cromatograma N5

Cromatograma N6

Cont....

Cromatograma N7

Cromatograma N8

Cromatograma N9

Cromatograma N10

Cromatograma N11

Cromatograma N12

Cont....

CROMATOGRAMAS (Tabela 28) – Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do nadolol em diferentes condições.

6.3.1 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO IBUPROFENO

TABELA 29. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO IBUPROFENO

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (100:1:0,2 v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 64,0$	0,50	Chiralcel OD [®]	IB1
Hexano:isopropanol:CF ₃ COOH (100:1:0,05 v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,20	Chiralcel OD [®]	IB2
Hexano:isopropanol:CF ₃ COOH (100:1:0,1 v/v/v)	254	1,0	2,0	0,25	$\pm 128,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	IB3
Hexano:metanol:CF ₃ COOH (100:1:0,2 v/v/v)	254	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,10	Chiralcel OD [®]	IB4
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:1:0,2 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm 64,0$	0,50	Chiralcel OD [®]	IB5
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:1:0,5 v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,50	Chiralcel OD [®]	IB6
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:1:1,0 v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,50	Chiralcel OD [®]	IB7
ACN:metanol:CH ₃ COOH:triethylamina (95:05:0,3:0,2 v/v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 200,0$	0,20	Chiradex [®]	IB8
ACN:metanol:CH ₃ COOH:triethylamina (95:05:0,3:0,2 v/v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	S - 200,0	0,20	Chiradex [®]	IB9
ACN:metanol:CH ₃ COOH:triethylamina (95:05:0,3:0,2 v/v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	Fase Móvel	0,20	Chiradex [®]	IB10

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromato grama
ACN:metanol:CH ₃ COOH:triethylamina (90:10:0,3:0,2 v/v/v/v)	254	1,0	0,5	0,25	$\pm 200,0$	0,02	Chiradex [®]	IB11
Tampão citrato (70mM):ACN:triethylamina (70:30:0,2 v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,20	Chiradex [®]	Não eluido
Tampão citrato (10mM):ACN:triethylamina (70:30:0,2 v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm 80,0$	0,10	Chiradex [®]	Não eluido

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior . .

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	pH da fase móvel	Cromatograma
Acetonitrila:etanol (act. am. 5 mM) (90:10 v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	6,5	IB15
Acetonitrila:etanol (act. am. 5 mM) (90:10 v/v)	225	1,0	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	α -Burke 2 [®]	6,5	IB16
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (50:50:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	5,5	IB17
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (50:50:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	α -Burke 2 [®]	5,5	IB18
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (50:50:0,3 v/v/v)	225	0,5	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	5,5	IB19
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,20	α -Burke 2 [®]	4,0	IB20
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	S- 80,0	0,20	α -Burke 2 [®]	4,0	IB21
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	**	0,20	α -Burke 2 [®]	4,0	IB22
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (97:03:0,3 v/v/v)	248	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	4,0	IB23
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (97:03:0,3 v/v/v)	248	1,0	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	α -Burke 2 [®]	4,0	IB24

Volume injetado (20 μL)

** A mistura contém hexano:etanol:CH₃COOH na mesma proporção em que a solução da amostra foi preparada, porém sem o ibuprofeno

act. am. = acetato de amônio

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	pH da fase móvel	Cromatograma
Hexano:etanol (97:03 v/v)	225	0,7	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	6,2	IB25
Hexano:etanol (97:03 v/v)	225	0,7	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	α -Burke 2 [®]	6,2	IB26
Hexano:etanol (97:03 v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	6,2	IB27
Diclorometano:etanol:CH ₃ COOH (80:20:0,1 v/v/v)	225	0,5	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	α -Burke 2 [®]	4,2	IB28
Diclorometano:etanol:CH ₃ COOH (80:20:0,1 v/v/v)	225	0,5	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	α -Burke 2 [®]	4,2	IB29

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	pH da fase móvel	Cromatograma
Acetonitrila:tampão citrato (5mM) (30:70 v/v)	254	1,2	1,0	0,25	$\pm$ 500,0	0,05	Chiradex [®]	6,0	IB30
Acetonitrila:tampão citrato (70mM) (40:60 v/v)	254	1,2	2,0	0,25	$\pm$ 500,0	0,05	Chiradex [®]	6,0	IB31
Acetonitrila:tampão citrato (70mM) (40:60 v/v)	254	1,2	2,0	0,25	Tampão citrato 70mM	0,05	Chiradex [®]	6,0	IB32
Acetonitrila:tampão citrato (70mM) (40:60 v/v)	254	1,2	2,0	0,25	Acetonitrila	0,05	Chiradex [®]	6,0	IB33
Acetonitrila:água:triethylamina (60:40:0,03 v/v/v)	254	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 1000,0	0,05	Chiradex [®]	4,0	IB34

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol:ac. acético (80:20:0,5 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB35
Hexano:isopropanol:ac. acético (98:2:0,5 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB36
Hexano:isopropanol:ac. acético (98:2:0,5 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	Etanol	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB37
Hexano:isopropanol:ac. acético (98:2:0,5 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	Isopropanol	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB38
Hexano:isopropanol:ac. acético (98:2:0,5 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	Hexano	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB39
Hexano:isopropanol:ac. acético (98:2:0,1 v/v/v)	225	0,9	8,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB40
Hexano:isopropanol:ac. acético (98:2:0,05 v/v/v)	225	0,9	4,0	0,25	$\pm 64,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB41
Hexano:isopropanol:ac. acético (99:1:0,2 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB42
Hexano:isopropanol:ac. acético (99:1:0,2 v/v/v)	225	0,9	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB43
Hexano:etanol (99:1 v/v)	225	0,8	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB44
Hexano:etanol:ac. acético (99:1:0,5 v/v/v)	225	0,8	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB45
Hexano:etanol:ac. acético (99:1:0,2 v/v/v)	263	0,8	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB46
Hexano:etanol:ac. acético (99:1:0,2 v/v/v)	263	0,8	1,0	0,25	S- 80,0	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB47
Hexano:etanol:ac. acético (99:1:0,1 v/v/v)	225	0,8	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB48

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:etanol:ac. Acético (99:1:0,05 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB49
Hexano:etanol:ac. Acético (99:1:0,05 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB50
Hexano:etanol:ac. Acético (99:1:0,05 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB51
Hexano:etanol:ac. Acético (98:2:0,05 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB52
Hexano:etanol:ac. acético (98:2:0,05 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB53
Hexano:etanol:ac. acético (97:3:0,1 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB54
Hexano:etanol:ac. acético (97:3:0,1 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	S- 80,0	0,10	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB55
Hexano:etanol:ac. acético (95:5:0,5 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB56
Hexano:etanol:ac. acético (95:5:0,5 v/v/v)	254	0,5	1,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB57
Hexano:isopropanol:ac. acético (95:5:0,1 v/v/v)	225	0,9	8,0	0,25	$\pm$ 160,0	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB58
Hexano:isopropanol:ac. acético (96:4:0,2 v/v/v)	225	0,9	1,0	--	$\pm$ 160,0	0,05	(S, S) Whelk-O 1 [®]	IB59

Volume injetado (20 μL),

Cromatograma IB1

Cromatograma IB2

Cromatograma IB3

Cromatograma IB4

Cromatograma IB5

Cromatograma IB6

Cont...

Cromatograma IB7

Cromatograma IB8

Cromatograma IB9

Cromatograma IB10

Cromatograma IB11

Cont....

Cromatograma IB15

Cromatograma IB16

Cromatograma IB17

Cromatograma IB18

Cromatograma IB19

Cromatograma IB20

Cont...

Cromatograma IB21

Cromatograma IB22

Cromatograma IB23

Cromatograma IB24

Cromatograma IB25

Cromatograma IB26

Cont...

Cromatograma IB27

Cromatograma IB28

Cromatograma IB29

Cromatograma IB30

Cont. . .

Cont....

Cromatograma IB37

Cromatograma IB38

Cromatograma IB39

Cromatograma IB40

Cromatograma IB41

Cromatograma IB42

Cont....

Cromatograma IB43

Cromatograma IB44

Cromatograma IB45

Cromatograma IB46

Cont....

Cromatograma IB47

Cromatograma IB48

Cromatograma IB49

Cromatograma IB50

Cromatograma IB51

Cromatograma IB52

Cont..

Cromatograma IB53

Cromatograma IB54

Cromatograma IB55

Cromatograma IB56

Cont....

Cromatograma IB57

Cromatograma IB58

Cromatograma IB59

CROMATOGRAMAS (Tabela 29) – Ensaaios preliminares para a separação enantiomérica do ibuprofeno em diferentes condições.

6.3.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FLURBIPROFENO

TABELA 30. ENSAIOS PRELIMINARES PARA A SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FLURBIPROFENO

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (97:3:0,3 v/v/v)	254	1,0	0,5	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F1
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (97:3:0,3 v/v/v)	254	1,0	2,0	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F2
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (97:03:0,3 v/v/v)	254	0,5	0,5	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F3
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (95:05:0,2 v/v/v)	254	1,0	0,5	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F4
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (95:05:0,2 v/v/v)	254	1,0	0,5	0,50	$\pm 8,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F5
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (90:10:0,2 v/v/v)	254	1,0	0,5	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F6
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (100:01:0,2 v/v/v)	254	1,0	0,5	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F7
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (100:01:0,2 v/v/v)	254	0,5	0,5	0,50	$\pm 16,0$	0,05	Chiralcel OD [®]	F8
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (100:02:0,2 v/v/v)	248	1,0	4,0	0,25	$\pm 16,0$	0,02	Chiralcel OD [®]	F9
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (100:01:0,2 v/v/v)	248	1,0	1,0	0,25	$\pm 64,0$	0,10	Chiralcel OD [®]	F10
Hexano:isopropanol:CF ₃ COOH (100:01:0,1 v/v/v)	248	1,0	1,0	0,25	$\pm 160,0$	0,20	Chiralcel OD [®]	F11

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromato grama
Hexano:isopropanol:CF ₃ COOH (100:01:0,05 v/v/v)	248	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,20	Chiralcel OD [®]	F12
Hexano:metanol:CF ₃ COOH (100:01:0,2 v/v/v)	248	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,10	Chiralcel OD [®]	F13
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:01:0,2 v/v/v)	248	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 64,0	0,10	Chiralcel OD [®]	F14
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:01:0,2 v/v/v)	248	0,7	1,0	0,25	$\pm$ 64,0	0,10	Chiralcel OD [®]	F15
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:01:0,5 v/v/v)	248	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 64,0	0,10	Chiralcel OD [®]	F16
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:01:1,0 v/v/v)	248	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 64,0	0,50	Chiralcel OD [®]	F17
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (100:01:1,0 v/v/v)	248	0,7	1,0	0,25	$\pm$ 64,0	0,50	Chiralcel OD [®]	F18
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (97:03:0,2 v/v/v)	248	1,0	0,5	0,50	$\pm$ 16,0	0,05	Chiralcel OD [®]	F19
Hexano:etanol:CH ₃ COOH:dietilamina (90:10:0,1:0,1 v/v/v/v)	248	1,0	4,0	0,25	$\pm$ 32,0	0,02	Chiralcel OD [®]	F20
ACN:metanol:CH ₃ COOH:trietilamina (95:05:0,3:0,2 v/v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	$\pm$ 200,0	0,20	Chiradex [®]	F21
ACN:metanol:CH ₃ COOH: trietilamina (90:10:0,3:0,2 v/v/v/v)	254	1,0	0,5	0,25	$\pm$ 200,0	0,05	Chiradex [®]	F22
ACN:metanol:CH ₃ COOH: trietilamina (95:05:0,3:0,2 v/v/v/v)	225	1,0	1,0	0,25	S(+)- 200,0	0,20	Chiradex [®]	F23

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração Injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	pH da fase móvel	Cromatograma
Acetonitrila:etanol(act. am. 5 mM) (90:10 v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm 96,0$	0,10	α -Burke 2 [®]	6,5	F24
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (50:50:0,3 v/v/v)	225		2,0	0,25	$\pm 96,0$	0,10	α -Burke 2 [®]	5,5	F25
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (50:50:0,3 v/v/v)	225	0,5	2,0	0,25	$\pm 96,0$	0,10	α -Burke 2 [®]	5,5	F26
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm 160,0$	0,20	α -Burke 2 [®]	4,0	F27
Acetonitrila:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,3 v/v/v)	225	1,0	2,0	0,25	**	0,20	α -Burke 2 [®]	4,0	F28
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (97:03:0,3 v/v/v)	248	1,0	2,0	0,25	$\pm 160,0$	0,10	α -Burke 2 [®]	4,0	F29
Acetonitrila:etanol (97:03 v/v)	225	1,0	2,0	0,25	$\pm 160,0$	0,10	α -Burke 2 [®]	6,2	F30
Diclorometano:etanol:CH ₃ COOH (80:20:0,1 v/v/v)	225	0,5	2,0	0,25	$\pm 160,0$	0,10	α -Burke 2 [®]	4,2	F31
Acetonitrila:tampão citrato (5mM) (30:70 v/v)	254	1,2	8,0	0,25	$\pm 1000,0$	0,05	Chiradex [®]	6,0	F32
Acetonitrila:tampão citrato (70mM) (30:70 v/v)	254	1,0	2,0	0,25	$\pm 40,0$	0,05	Chiradex [®]	4,0	F33
Acetonitrila:tampão citrato (70mM) (40:60 v/v)	254	1,0	8,0	0,25	$\pm 100,0$	0,05	Chiradex [®]	6,0	F34
Acetonitrila:água:triethylamina (60:40:0,03 v/v/v)	254	1,0	2,0	0,25	$\pm 40,0$	0,05	Chiradex [®]	4,0	F35

Volume injetado (20 μL)

** A mistura contém hexano:etanol:CH₃COOH na mesma proporção em que a solução da amostra foi preparada, porém sem o flurbiprofeno

act. am. = acetato de amônio

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração Injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (80:20:0,5 v/v/v)	254	0,9	8,0	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F36
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (96:04:0,1 v/v/v)	246	0,9	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F37
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (96:04:0,1 v/v/v)	246	0,8	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F38
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (98:02:0,5 v/v/v)	254	0,9	8,0	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F39
Hexano:isopropanol:CH ₃ COOH (99:01:0,2 v/v/v)	254	0,9	1,0	0,25	$\pm 24,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F40
Hexano:etanol (99:01 v/v)	225	0,8	1,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F41
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (99:01:0,2 v/v/v)	263	0,8	1,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F42
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (99:01:0,2 v/v/v)	263	0,8	1,0	0,25	S(+)- 8,0	0,05	Whelk-O 1 [®]	F42 S
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (99:01:0,05 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F43
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (98:02:0,05 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F44
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (97:03:0,1 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F45
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (97:03:0,1 v/v/v)	225	0,8	2,0	0,25	S(+)- 8,0	0,05	Whelk-O 1 [®]	F45 S
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (96:04:0,5 v/v/v)	254	0,9	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Whelk-O 1 [®]	F46

Volume injetado (20 μL)

continuação da Tabela anterior ...

Fase Móvel	Comprimento de onda (λ) (nm)	Vazão (mL/min.)	Atenuação	Velocidade de papel (cm/min.)	Concentração Injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Sensibilidade (AU/MV)	Tipo de coluna	Cromatograma
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (96:04:0,5 v/v/v)	246	0,9	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Welk-O 1 [®]	F47
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (96:04:0,5 v/v/v)	246	0,8	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Welk-O 1 [®]	F48
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,5 v/v/v)	254	0,9	8,0	0,25	$\pm 80,0$	0,05	Welk-O 1 [®]	F49
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,1 v/v/v)	246	0,9	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Welk-O 1 [®]	F50
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,1 v/v/v)	246	0,8	2,0	0,25	$\pm 16,0$	0,05	Welk-O 1 [®]	F51
Hexano:etanol:CH ₃ COOH (95:05:0,2 v/v/v)	246	0,9	1,0	---	$\pm 16,0$	0,05	Welk-O 1 [®]	F52

Volume injetado (20 μL)

Cromatograma F1

Cromatograma F2

Cromatograma F3

Cromatograma F4

Cromatograma F5

Cromatograma F6

Cont....

Cont....

Cromatograma F13

Cromatograma F14

Cromatograma F15

Cromatograma F16

Cromatograma F17

Cromatograma F18

Cont....

Cromatograma F19

Cromatograma F20

Cromatograma F21

Cromatograma F22

Cromatograma F23

Cont....

Cromatograma F24

Cromatograma F25

Cromatograma F26

Cromatograma F27

Cont....

Cromatograma F28

Cromatograma F29

Cromatograma F30

Cromatograma F31

Cont...

Cont....

Cont....

Cromatograma F40

Cromatograma F41

Cromatograma F42

Cromatograma F42 S

Cromatograma F43

Cromatograma F44

Cont....

Cromatograma F45

Cromatograma F45 S

Cromatograma F46

Cromatograma F47

Cromatograma F48

Cromatograma F49

Cont....

CROMATOGRAMAS (Tabela 30) – Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do flurbiprofeno em diferentes condições.

6.4 DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO ATENOLOL

A separação enantiomérica do atenolol pode ser observada na Figura 25. A separação foi obtida utilizando-se coluna do tipo Chiralcel OD[®]

FIGURA 25. Cromatogramas do atenolol. Condições: Fase estacionária quiral: Chiralcel OD[®] ; Fase móvel: Hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v); Vazão: 1,0 mL/min.; Detecção: UV 276nm; Temperatura: ambiente (24°C ± 2); (a) = R-atenolol, (b) = S-atenolol, (c) = R, S-atenolol.

6.4.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração do R-atenolol e do S-atenolol e os resultados obtidos após tratamento estatístico dos valores experimentais podem ser visualizados nas Figuras 26 e 27, respectivamente. Os valores do coeficiente de correlação (r) próximos a 1,0 comprovam a linearidade do método⁽¹⁰⁵⁾.

FIGURA 26. Curva de calibração do R-atenolol. Equação da reta : $Y = 282,09 X - 787,1$; Coeficiente de correlação : $r = 0,9991$

FIGURA 27. Curva de calibração do S-atenolol. Equação da reta : $Y = 255,12 X - 1149,7$; Coeficiente de correlação : $r = 0,9980$

6.4.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE (R,S)-ATENOLOL EM AMOSTRAS COMERCIAIS

A Figura 28 apresenta os cromatogramas das amostras A, B, C e D e dos placebos das amostras. Pode-se observar que os excipientes não interferiram na análise enantiomérica de R, S-atenolol nos medicamentos.

FIGURA 28. Cromatogramas das amostras A, B, C e D contendo R, S-atenolol. Condições: Fase estacionária quiral: Chiralcel OD®; Fase móvel: hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v); Vazão: 1,0 mL/min.; Detecção: UV 276nm; Temperatura: ambiente (24°C ± 2)

A Tabela 31 apresenta valores para os parâmetros que comprovam que o método é adequado para a análise de R, S-atenolol nas amostras comerciais. Entre eles estão, a seletividade e a resolução dos picos.

TABELA 31. PARÂMETROS OBTIDOS QUE COMPROVAM A EFICIÊNCIA DO MÉTODO PROPOSTO

Amostras	$K_1 = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$	$K_2 = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$	$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$	$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$
A (AT)	0,4	1,5	4,4	4,2
B (AT)	0,4	1,6	4,1	4,2
C (AT)	0,4	1,7	4,0	4,6
D (AT)	0,4	1,6	4,3	4,1

6.4.3 TESTE DE PRECISÃO DO MÉTODO

Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos valores experimentais do R-atenolol e do S-atenolol encontram-se na Tabela 32.

TABELA 32. DADOS REPRESENTANDO A PRECISÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA A ANÁLISE DAS AMOSTRAS A, B, C e D.

Amostra	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)	Limite de confiança (%) ^{p=95%}	Limite de detecção (ng/mL)	Limite de quantificação (ng/mL)
R-Isômero					
A (AT)	1,15	1,15	100,1 ± 0,8	2,200	40,80
B (AT)	0,72	0,74	96,7 ± 0,5	7,600	25,50
C (AT)	1,07	1,05	101,7 ± 0,8	11,40	37,90
D (AT)	0,84	0,84	100,6 ± 0,6	8,900	29,80
S-Isômero					
A (AT)	1,39	1,33	104,7 ± 1,0	16,30	54,50
B (AT)	0,99	0,99	100,8 ± 0,7	11,60	38,80
C (AT)	1,23	1,17	104,5 ± 0,9	14,50	48,20
D (AT)	1,26	1,26	99,5 ± 0,9	14,80	49,40

A Tabela 33 apresenta as proporções de R- atenolol e de S-atenolol presentes nas amostras comerciais A, B, C e D. Os valores comprovam a presença dos isômeros em proporção igual, ou seja na mistura racêmica.

TABELA 33. PROPORÇÕES DE R-ATENOLOL E DE S-ATENOLOL PRESENTES NAS AMOSTRAS COMERCIAIS A, B, C e D

Amostra*	R-isômero (%)** (Limite de confiança %) ^{P=95%}	S-isômero (%)** (Limite de confiança %) ^{P=95%}
A (AT)	49,97 (100,1 ± 0,8)	50,03 (104,7 ± 1,0)
B (AT)	49,96 (96,7 ± 0,5)	50,04 (100,8 ± 0,7)
C (AT)	50,35 (101,7 ± 0,8)	49,65 (104,5 ± 0,9)
D (AT)	49,97 (100,6 ± 0,6)	50,03 (99,5 ± 0,9)

Os valores da Tabela representam a média de 10 determinações: AT 200,0 µg/mL

* Amostras preparadas como descrito para o teste da repetibilidade

** Valores calculados de acordo com a Farmacopéia Americana 24 ed ⁽²⁰⁴⁾

6.4.4 TESTES DE RECUPERAÇÃO

Os resultados dos testes de recuperação efetuados nas amostras comerciais podem ser observados nas Tabelas 34 e 35.

TABELA 34. RESULTADOS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DO (R)-ENANTIÔMERO DO ATENOLOL ADICIONADA ÀS AMOSTRAS A, B, C e D E ANALISADAS PELO MÉTODO PROPOSTO.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação (%)
R-AT			
A	50,00	$51,56 \pm 0,9$	103,1
	62,50	$62,68 \pm 1,0$	100,3
	75,00	$74,83 \pm 1,3$	99,80
B	50,00	$50,81 \pm 1,3$	101,6
	62,50	$61,87 \pm 1,5$	99,00
	75,00	$72,87 \pm 1,3$	97,20
C	50,00	$50,17 \pm 1,7$	100,3
	62,50	$65,42 \pm 1,6$	104,7
	75,00	$77,03 \pm 1,4$	102,7
D	50,00	$49,32 \pm 1,6$	98,60
	62,50	$64,46 \pm 1,4$	103,1
	75,00	$77,20 \pm 1,4$	102,9

* média de três determinações

TABELA 35. RESULTADOS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DO (S)-ENANTIÔMERO DO ATENOLOL ADICIONADA ÀS AMOSTRAS A, B, C e D E ANALISADAS PELO MÉTODO PROPOSTO.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação (%)
S-AT			
A	50,00	$51,28 \pm 1,0$	102,6
	62,50	$61,30 \pm 1,0$	98,10
	75,00	$71,97 \pm 1,2$	96,00
B	50,00	$50,69 \pm 1,7$	101,4
	62,50	$63,01 \pm 1,6$	100,8
	75,00	$75,07 \pm 1,7$	100,1
C	50,00	$49,93 \pm 1,3$	99,90
	62,50	$64,82 \pm 1,1$	103,7
	75,00	$76,14 \pm 1,0$	101,5
D	50,00	$50,17 \pm 0,9$	100,3
	62,50	$62,97 \pm 1,0$	100,8
	75,00	$75,06 \pm 1,2$	100,1

* média de três determinações

6.5 DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO METOPROLOL

A separação enantiomérica do metoprolol pode ser observada na Figura 29. A separação foi obtida utilizando-se coluna do tipo Chiralcel OD[®].

FIGURA 29. Cromatogramas do metoprolol. Condições: Fase estacionária quiral: Chiralcel OD[®]; Fase móvel: Hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v); Vazão: 0,8 mL/min.; Detecção: UV 276nm; Temperatura: ambiente (24°C ± 2); (a) = R-metoprolol, (b) = S-metoprolol, (c) = R,S-metoprolol.

6.5.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração do R-metoprolol e do S-metoprolol e os resultados obtidos após tratamento estatístico dos valores experimentais podem ser visualizados nas Figuras 30 e 31, respectivamente. Os valores dos coeficientes de correlação (r) próximos a 1,0 comprovam a linearidade do método ⁽¹⁰⁵⁾.

FIGURA 30. Curva de calibração do R-metoprolol. Equação da reta: $Y = 321,88 X - 263,05$; Coeficiente de correlação: $r = 0,9988$

FIGURA 31. Curva de calibração do S-metoprolol. Equação da reta: $Y = 319,31 X - 620,81$; Coeficiente de correlação: $r = 0,9990$

6.5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE (R,S)-METOPROLOL EM AMOSTRAS COMERCIAIS

A Figura 32 apresenta os cromatogramas da amostra E, do placebo 1 e do placebo 2. Pode-se constatar que os excipientes não interferem na análise enantiomérica de R, S-metoprolol.

FIGURA 32. Cromatogramas da amostra contendo R, S-metoprolol e dos placebos da amostra. Condições: Fase estacionária quiral: Chiralcel OD[®]; Fase móvel: Hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v); Vazão: 0,8 mL/min.; Detecção: UV 276nm; Temperatura: ambiente (24°C ± 2)

A Tabela 36 apresenta os valores para os parâmetros que comprovam que o método é adequado para análise de R, S-metoprolol nas amostras comerciais, entre eles estão a seletividade e a resolução dos picos.

TABELA 36. PARÂMETROS OBTIDOS QUE COMPROVAM A EFICIÊNCIA DO MÉTODO PROPOSTO

Amostra	$K_1 = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$	$K_2 = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$	$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$	$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$
E (MT)	0,2	1,5	9,7	5,2

6.5.3 TESTE DE PRECISÃO DO MÉTODO

Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos valores experimentais para o R-metoprolol e S-metoprolol encontram-se na Tabela 37.

TABELA 37. DADOS REPRESENTANDO A PRECISÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DO METOPROLOL NA AMOSTRA COMERCIAL E.

Amostra E	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)	Limite de confiança (%) ^{p=95%}	Limite de Detecção (ng/mL)	Limite de Quantificação (ng/mL)
R-Isômero	0,80	0,86	93,2 ± 0,6	7,500	24,90
S-Isômero	1,32	1,40	94,4 ± 0,9	12,40	41,30

A Tabela 38 apresenta as proporções de R- metoprolol e S-metoprolol presentes na amostra comercial E. Os valores comprovam a presença dos isômeros em proporção igual, ou seja, na mistura racêmica.

TABELA 38. PROPORÇÕES DE R-METOPROLOL E S-METOPROLOL PRESENTES NA AMOSTRA COMERCIAL E.

Amostra*	R-isômero (%)** (Limite de confiança %) ^{p=95%}	S-isômero (%)** (Limite de confiança %) ^{p=95%}
E (MT)	50,20 (93,2 ± 0,6)	49,80 (94,4 ± 0,9)

Os valores da Tabela representam a média de 10 determinações: MT 160,0 µg/mL

* Amostras preparadas como descrito para o teste da repetibilidade

** Valores calculados de acordo com a Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾

6.5.4 TESTES DE RECUPERAÇÃO

Os resultados dos testes de recuperação efetuados nas amostras comerciais podem ser observados na Tabelas 39 e 40.

TABELA 39 RESULTADOS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DO (R)-ENANTIÔMERO DO METOPROLOL ADICIONADA À AMOSTRA E, ANALISADAS PELO MÉTODO PROPOSTO.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação (%)
R-MT	40,00	$38,92 \pm 1,1$	97,30
	50,00	$49,27 \pm 1,1$	98,50
	60,00	$60,01 \pm 0,9$	100,0

* média de três determinações

TABELA 40. RESULTADOS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DO (S)-ENANTIÔMERO DO METOPROLOL ADICIONADA À AMOSTRA E, ANALISADAS PELO MÉTODO PROPOSTO.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração encontrada $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}$)*	Recuperação (%)
S-MT	40,00	$38,50 \pm 1,7$	96,30
	50,00	$50,11 \pm 1,6$	100,2
	60,00	$61,02 \pm 1,4$	101,7

* média de três determinações

6.6 DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO FLURBIPROFENO

A separação enantiomérica do flurbiprofeno pode ser observada na Figura 33. A separação foi obtida utilizando-se coluna do tipo Whelk-O 1[®].

FIGURA 33. Cromatograma do flurbiprofeno, (a) S-flurbiprofeno (6,000 μ g/mL) (Padrão), (b) (R/S)-flurbiprofeno (12,00 μ g/mL) (Amostra F). Condições: Fase estacionária quiral: Whelk-O 1[®]; Fase móvel: Hexano:etanol:ácido acético (95:5:0,2 v/v/v); Vazão: 0,9mL/min.; Detecção UV: 246 nm; Temperatura controlada com forno em 24°C $\pm$ 1; Volume de injeção: 20 μ L.

6.6.1 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração do S-flurbiprofeno e os resultados obtido após tratamento estatístico dos valores experimentais pode ser visualizado na Figura 34. O valor do coeficiente de correlação (r) próximo a 1,0 comprova a linearidade do método ⁽¹⁰⁵⁾.

FIGURA 34. Curva de calibração do S-flurbiprofeno. Equação da reta: $Y = 94499X - 54820$; Coeficiente de correlação: $r = 0,9993$

6.6.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE (R,S)-FLURBIPROFENO EM AMOSTRAS COMERCIAIS

A Tabela 41 apresenta os valores para os parâmetros que comprovam que o método é adequado para análise de R, S-flurbiprofeno na amostra comercial, entre eles estão a seletividade e a resolução dos picos.

TABELA 41. PARÂMETROS OBTIDOS QUE COMPROVAM A EFICIÊNCIA DO MÉTODO PROPOSTO

Amostra	$K_1 = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$	$K_2 = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$	$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$	$Rs = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$	$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$	$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$
F	0,77 *	0,97 *	1,26 *	2,54 *	9683 **	8342 ***

* média de dez determinações

** R-FLU número de pratos teóricos, média das dez determinações

*** S-FLU número de pratos teóricos, média das dez determinações

6.6.3 TESTE DE PRECISÃO DO MÉTODO

Os resultados obtidos no tratamento estatístico dos valores experimentais para o R-flurbiprofeno e S-flurbiprofeno encontram-se na Tabela 42.

TABELA 42. DADOS REPRESENTANDO A PRECISÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA ANÁLISE DOS ENANTIÔMEROS DO FLURBIPROFENO NA AMOSTRA COMERCIAL F.

Amostra F	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)	Limite de confiança (%) ^{p=95%}	Limite de detecção (pg)	Limite de quantificação (pg)
Nível baixo (8,000µg/mL)					
R-Isômero	0,17	0,16	105,32 ± 0,12	---	---
S-isômero	0,15	0,14	104,55 ± 0,11	4,700	20,00
Nível alto (20,00µg/mL)					
R-Isômero	0,24	0,23	104,35 ± 0,17	---	---
S-Isômero	0,48	0,46	104,38 ± 0,34	14,90	49,70

A Tabela 43 apresenta as proporções de R-flurbiprofeno e S- flurbiprofeno presentes na amostra comercial F. Os valores comprovam a presença dos isômeros em proporção igual, ou seja, na mistura racêmica.

TABELA 43. PROPORÇÕES DE R-FLURBIPROFENO E S-FLURBIPROFENO PRESENTES NA AMOSTRA COMERCIAL F.

Amostra	Nível de concentração	R-isômero (%)	S-isômero (%)
		(limite de confiança %) ^{p=95%}	(limite de confiança %) ^{p=95%}
F**	8,000µg/mL	50,18 (105,32 ± 0.12)*	49,82 (104,55 ± 0,11)*
	20,00µg/mL	49,98 (104,35 ± 0.17)*	50,02 (104,38 ± 0.34)*

Valores calculados de acordo com a Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾

* Resposta média de dez determinações em dois níveis de concentração (8,000µg/mL, 20,00µg/mL)

** As amostras foram preparadas conforme descrito para o teste de precisão

6.6.4 TESTES DE RECUPERAÇÃO

Os resultados dos testes de recuperação efetuados nas amostras comerciais podem ser observados na Tabelas 44 e 45.

TABELA 44. RESULTADOS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DO (R)-ENANTIÔMERO DO FLURBIPROFENO ADICIONADA À AMOSTRA F, ANALISADA PELO MÉTODO PROPOSTO.

Amostra F	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração recuperada ± DPR (µg/mL)*	Recuperação do padrão (%)
R-FLU	4,000	4,020 ± 0,07	100,5
	5,000	5,010 ± 0,08	100,2
	6,000	5,980 ± 0,03	99,70

* média de três determinações

TABELA 45. RESULTADOS DO TESTE DE RECUPERAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DO (S)-ENANTIÔMERO DO FLURBIPROFENO ADICIONADA À AMOSTRA F, ANALISADA PELO MÉTODO PROPOSTO.

Amostra F	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração recuperada ± DPR (µg/mL)*	Recuperação do padrão (%)
S-FLU	4,00	4,030 ± 0,21	100,7
	5,00	5,020 ± 0,04	100,4
	6,00	6,010 ± 0,06	100,2

* média de três determinações

7. DISCUSSÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral (CLAE-FEQ) é usada normalmente em laboratórios de pesquisa para a determinação qualitativa das entidades enantioméricas individuais nos fármacos quirais. A Farmacopéia Americana ⁽²⁰⁴⁾, a Brasileira ⁽⁶⁷⁾, a Européia ⁽⁶⁴⁾ e a Britânica ⁽²⁴⁾ descrevem o método da rotação óptica para a determinação da atividade óptica dos fármacos. No entanto, este método não conduz à obtenção de resultados quantitativos.

A importância dos fármacos do grupo dos β -bloqueadores na terapêutica cardiovascular pode ser refletida pelo acréscimo no mercado mundial, das formas enantioméricas isoladas nos últimos três anos ⁽¹⁸⁷⁾. A venda anual de isômero puro ou isolado passou da marca de 123,3 bilhões de dólares norte americanos. O mercado dos fármacos cardiovasculares na forma de enantiômero isolado subiu de 24,8 bilhões de dólares americanos em 1999, para 26,9 bilhões de dólares no ano 2000 ⁽¹⁸⁷⁾.

Nas últimas duas décadas a CLAE-FEQ deu grandes passos e se estabeleceu como opção principal, não somente para a determinação enantiomérica, mas também, para a obtenção de isômeros puros em grande escala. Este aumento foi conseguido graças a uma nova técnica de cromatografia líquida conhecida como cromatografia de “simulated moving-bed” (SMB), que tem a capacidade de isolar e separar isômeros puros em quantidades de até 4 kg por dia ^(73, 144, 187, 225).

Diversos métodos podem ser encontrados na literatura descrevendo a separação dos enantiômeros dos β -bloqueadores e dos antiinflamatórios não-esteróides, mas, raramente, é citada a determinação quantitativa na matéria-prima e em formulações farmacêuticas comercializadas utilizando CLAE-FEQ.

Neste trabalho foram utilizadas colunas do tipo Chiralcel OD[®], Chiradex[®], α -Burke 2[®] e Whelk-O 1[®] visando a padronização de metodologia simples e direta para separação e determinação dos enantiômeros de β -bloqueadores e de antiinflamatórios não-esteróides, em formulações farmacêuticas comercializadas no Brasil.

Os testes de adequação do sistema são partes integrantes do método de análise por cromatografia líquida. A resolução e a reprodutividade do método proposto são os fatores principais no processo de padronização. Com esta finalidade várias condições de análise foram testadas visando a obtenção de um sistema de análise otimizado.

7.1 ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV DAS SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO

Os fármacos foram solubilizados em solventes nos quais apresentaram solubilidade apropriada. Os espectros de absorção dos fármacos foram obtidos após diluições na fase móvel adequada para cada fármaco selecionado. Este procedimento foi adotado para evitar qualquer discrepância ou interferência por parte dos solventes durante o estudo.

Na cromatografia líquida de alta eficiência, a seletividade e a resolução dos picos, assim como, o limite de detecção e o nível de ruído do sistema, podem ser controlados e minimizados pela escolha cuidadosa do comprimento de onda de absorção dos compostos em estudo ⁽¹⁸⁴⁾.

Observando-se os espectros obtidos (Figuras 18 a 22), notam-se picos de absorção máxima em torno de 225nm e na faixa entre 276 a 280nm para os β -bloqueadores. Para o ibuprofeno, as absorções máximas foram obtidas a 225nm e a 254nm (Figura 23). O flurbiprofeno apresentou uma absorção máxima a 207,50nm e outra a 246,50nm (Figura 24).

A escolha do comprimento de onda também influencia a concentração de leitura, a linha de base, a estabilidade do sistema e os fatores interferentes, como excipientes e solventes. Assim por exemplo, o metoprolol foi detectado em dois comprimentos de ondas; em 225nm (Cromatograma M3) apresentou linha de base instável, além de sofrer interferência de outras substâncias. Já com detecção em 276nm, observou-se diminuição desses problemas.

Com base nos espectros obtidos e em trabalhos anteriormente citados na literatura, foram testados vários comprimentos de ondas de absorção para obter-se um balanço entre o limite de detecção apropriado e a viabilidade de detecção. As mudanças nos comprimentos de onda serão apresentadas e discutidas mais adiante. Basicamente, foi escolhido o comprimento de onda de 276nm para os β -bloqueadores, com exceção do pindolol, para o qual a detecção foi efetuada a 254nm. No caso do ibuprofeno foi escolhido o comprimento de onda, 254nm e para o flurbiprofeno, 225nm com coluna do tipo Chiradex[®]. Quando a coluna do tipo Whelk-O 1[®] foi empregada, os comprimentos de ondas selecionados foram 225nm e 246nm, para o ibuprofeno e para o flurbiprofeno, respectivamente.

7.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS β -BLOQUEADORES

7.2.1 SEPARAÇÕES COM COLUNA DO TIPO CHIRALCEL OD[®]

É bem reconhecido que o método cromatográfico que utiliza fases estacionárias quirais (FEQs) oferece vantagens distintas sobre as técnicas clássicas de separações enantioméricas de fármacos quirais. Colunas quirais como a Chiralcel OD[®] tem sido úteis especialmente na separação dos enantiômeros de compostos da classe dos aminoálcoois (ariletanolaminas). As colunas tipo Chiralcel OD[®] facilitam a automatização do método analítico, tornando possível as análises de grande número de amostras em tempos mais curtos ^(4, 60, 111, 117, 176, 192 227).

A coluna Chiralcel OD[®] é constituída por celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato). O mecanismo de reconhecimento quiral não está completamente elucidado, mas acredita-se que esteja baseado na formação de complexos de inclusão parcial, formação de pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo ^(2, 13, 150, 209). Na separação dos isômeros do atenolol e do metoprolol empregando-se esta fase estacionária, a interação de pontes de hidrogênio entre a hidroxila de ambos os fármacos (Figura 35) com o grupo carbonila do fenilcarbamato parece ser essencial para a resolução quiral efetiva ^(2, 13, 150, 209). Além da interação dipolo-dipolo entre o π -doador, o 3,5-dimetilfenilcarbamato da FEQ e o π -acceptor do grupo aril dos fármacos, a interação hidrofóbica entre a cavidade e o fármaco dá origem ao complexo de inclusão parcial ^(2, 13, 150, 209).

FIGURA 35. Interação entre a fase estacionária quiral da coluna Chiralcel OD[®] e os β -Bloqueadores ⁽¹⁾

A coluna Chiralcel OD[®] foi a escolhida pois, propicia a separação enantiomérica de vários β -bloqueadores. Por ser uma coluna de fase normal, os solventes normalmente empregados são solventes apolares. O hexano tem sido o solvente mais utilizado e recomendado ⁽⁴⁶⁾, juntamente com o etanol e o isopropanol, empregados como modificadores orgânicos. O ácido acético, a dietilamina e o ácido trifluoroacético são utilizados para melhorar o formato dos picos. Em alguns casos, até diminuem o tempo de retenção. Nesse trabalho foi utilizada a dietilamina, devido às características básicas dos β -bloqueadores.

A dietilamina é extremamente básica e foi usada, em pequenas quantidades, para diminuir a cauda dos picos. Além disso, em alguns casos, esta substância diminui o tempo de retenção e melhora o perfil do pico ^(150, 198). Devido ao caráter básico dos β -bloqueadores, a dietilamina foi escolhida como modificador orgânico. A dietilamina aumenta o pH da fase móvel para intervalos de 9 a 11 e evita interações secundárias entre fármacos básicos, tipo β -bloqueadores e os sítios dos silanóis da fase estacionária quiral e ainda, converte o grupo básico em uma das suas formas neutras. Assim, o tempo de retenção é reduzido e a cauda minimizada ^(198, 199).

Foram realizados testes empregando-se hexano, isopropanol, etanol e metanol em diferentes proporções, com e sem adição de dietilamina e/ou ácido acético. Aumentando-se a polaridade da fase móvel, seja pelo aumento da proporção de álcool ou por alteração do tipo de álcool (isopropanol ou etanol), observou-se diminuição do tempo de retenção. O álcool na fase móvel pode competir com os fármacos, pela fase estacionária para a formação de pontes de hidrogênio. O isopropanol, por ser um álcool de peso molecular maior do que o do etanol teria limitações estéricas maiores, apresentando menor competição com os analitos da fase estacionária ⁽¹¹²⁾. Os álcoois de alto peso molecular apresentam tendência reduzida para interagir por pontes de hidrogênio com a fase estacionária de celulose modificada, promovendo alta resolução enantiomérica para compostos que também competem com estes sítios potencialmente ativos.

No entanto, a escolha do álcool é caracterizada pelo tipo e pelo tempo de análise, o qual deve ser preferencialmente curto. Os ensaios preliminares com etanol e isopropanol indicaram resultados favoráveis ao etanol. A presença de base orgânica e de ácido orgânico, em pequenas quantidades na fase móvel apresentou efeito vantajoso sobre a separação enantiomérica do atenolol e do metoprolol, quando se empregou coluna Chiralcel OD[®].

De modo geral, observou-se que houve melhora na separação enantiomérica de fármacos básicos, como no caso de β -bloqueadores devido a presença de ácido acético. A adição de ácido aumenta a resolução (Rs) pela formação de picos agudos. Entretanto, os picos apresentaram também seletividade suficiente para separar os enantiômeros de β -bloqueadores, mesmo na ausência de ácido orgânico.

É bem conhecido o fato de que ácidos orgânicos quando presentes na fase móvel favorecem a formação de pares iônicos com os analitos básicos dos β -bloqueadores. O fato foi explorado neste trabalho para obter-se a separação enantiomérica do atenolol, do nadolol e do metoprolol, na forma de par iônico. Embora, o mecanismo de formação do par iônico não seja bem aceito no meio científico, TANG ⁽¹⁹⁹⁾ propôs recentemente um provável mecanismo envolvendo este fenômeno ^(198, 199).

PERSSEON e colaboradores ⁽¹⁵⁹⁾, em revisão recente, descreveram o efeito incomum da temperatura sobre a separação e a ordem de eluição empregando coluna do tipo Chiralcel OD[®]. A separação, especialmente a resolução e simetria dos picos, podem ser influenciadas pela mudança da temperatura na qual a coluna está sendo utilizada. Durante a otimização da separação enantiomérica utilizando FEQ derivada de polissacarídeo deve-se, portanto, considerar o efeito de temperatura sobre a resolução, a seletividade e fator de capacidade dos picos ⁽¹⁵⁹⁾. Deve-se, assim, manter as condições, tanto da temperatura ambiental quanto da temperatura da coluna, empregando, por exemplo, um forno.

7.2.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO METOPROLOL

Com base em trabalhos anteriores de SANTORO e colaboradores ^(40, 177), os isômeros do metoprolol foram separados utilizando-se coluna do tipo Chiralcel OD[®] e sistema de fase móvel constituído por hexano modificado com isopropanol e/ou etanol. A determinação da ordem de eluição foi possível durante a validação do processo por comparação com os isômeros puros na forma isolada. A ordem de eluição dos enantiômeros foi determinada por injeções isoladas de soluções do (R)-metoprolol e do (S)-metoprolol. Como era esperado, o (R)-isômero do metoprolol foi eluído em primeiro lugar (Figura 29).

Os resultados estão de acordo com os trabalhos publicados sobre a separação enantiomérica do metoprolol, utilizando coluna do tipo Chiralcel OD[®] e sistema de fase móvel constituído por hexano modificado com isopropanol ou etanol e dietilamina. Todos confirmaram a mesma ordem de eluição para os isômeros do metoprolol ^(14, 37, 121, 122, 174, 190).

É bem conhecido que o tempo de retenção dos isômeros do metoprolol é inversamente proporcional à concentração de isopropanol na fase móvel. Com aumento da polaridade da fase móvel, observa-se a diminuição do tempo de retenção ^(14, 193).

As separações preliminares estão apresentadas nos Cromatogramas M1, M2 e M3, que foram obtidos utilizando-se 30 % de modificador orgânico. Como mencionado anteriormente, com detecção a 225nm observou-se linha de base instável e maior tempo para estabilização do sistema (Cromatograma M3). Por esta razão, as detecções foram efetuadas no comprimento de onda de 276nm.

Com vazão da fase móvel de 0,7 mL/min, houve melhora na resolução e na seletividade dos picos do (R) e do (S)-metoprolol, que apresentaram tempo de retenção com picos de 6,86 e 10,32 min, respectivamente (Cromatograma M1). Com vazão da fase móvel de 1,0 mL/min. obteve-se melhor tempo de retenção para os isômeros (R) e (S), ou seja, 4,85 e 7,64 min, respectivamente. No entanto, houve comprometimento da resolução dos picos (Cromatograma M2).

Aumentado-se a polaridade da fase móvel, seja pelo aumento da proporção de álcool ou por alteração do tipo de álcool, isopropanol para etanol, por exemplo, houve diminuição no tempo de retenção para os dois isômeros.

Pelo fato de apresentar polaridade maior do que o isopropanol, o etanol foi testado na mesma concentração (30 %), juntamente com 0,1 % de dietilamina. Como esperado, a tendência competitiva do etanol impediu interação completa entre o soluto e as moléculas quirais da fase estacionária. Este sistema não apresentou nenhuma melhora na seletividade, além de influir negativamente na resolução dos picos. A dietilamina, definitivamente, melhorou o formato dos picos que podem ser observados no Cromatograma M4. Com a diminuição da concentração de etanol na fase móvel para 15 %, observou-se que os dois picos perderam a seletividade, como também, a resolução (Cromatograma M5).

Com base nos resultados obtidos experimentalmente, resolveu-se empregar isopropanol, como modificador orgânico. A dietilamina foi adicionada em quantidades pequenas com intuito de melhorar a resolução dos picos e diminuição da cauda.

Para obter-se concentração ótima do isopropanol na fase móvel, foram testadas três concentrações, 25, 35 e 30%, mantendo-se os outros parâmetros constantes. Os perfis dos picos estão apresentados nos Cromatogramas M6, M9 e M10, respectivamente. Pode-se observar no Cromatograma M6, que o tempo de retenção do (S)-metoprolol foi de 7,66 min., embora os picos tenham apresentado excelente resolução e seletividade.

Por outro lado, com fase móvel contendo 35 % de isopropanol, o (S)-metoprolol apresentou o melhor tempo de retenção (7,17 min.), mas a resolução foi comprometida (Cromatograma M9). Para análise quantitativa dos isômeros, é essencial que o sistema cromatográfico dê origem o cromatograma com boa resolução.

O sistema constituído por coluna do tipo Chiralcel OD[®], com fase móvel contendo hexano isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v), vazão de 1,0 mL/minuto e detecção em 276nm proporcionou a separação com os seguintes parâmetros: fator de capacidade $k_1=0,53$, $k_2=1,46$ e seletividade de 2,73 (Cromatograma M10).

Apesar do tempo curto de análise e excelente separação, o método não foi validado, pois os picos correspondentes aos enantiômeros apresentaram caudas e a linha de base no sistema não apresentou estabilidade.

De acordo com os resultados obtidos empregando-se etanol como modificador orgânico para a separação enantiomérica do atenolol, que mostraram ser promissores, resolveu-se utilizar esta sistema para a separação enantiomérica do metoprolol.

Nos Cromatogramas M11 e M12 são apresentadas separações incompletas dos enantiômeros do metoprolol empregando-se a fase móvel, hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,2 v/v/v) e vazões de 1,0 e 0,8 mL/min., respectivamente.

Visando atenuar a competição entre o soluto e o etanol com os sítios da fase estacionária quiral, foi diminuída a polaridade da fase móvel. Para tanto, foi empregada fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina (90:10:0,2 v/v/v), com vazão de 1,0 ou 0,5 mL/min.

Os Cromatogramas M13 e M14 ilustram tentativas de separação dos enantiômeros do metoprolol. Não foram obtidos bons resultados visto que a separação não se completou até a linha de base.

Com base nos ensaios apresentados anteriormente pode-se observar que a vazão da fase móvel não influencia a separação dos isômeros de forma acentuada. Por outro lado, fluxos menores podem aumentar o tempo de análise pelo deslocamento de ambos os picos.

Outras fases móveis como hexano:etanol:dietilamina nas proporções de: 95:05:0,1 ; 95:05:0,2 e 98:02:0,2 v/v/v, com vazão de 1,0 mL/min. também foram utilizadas. Os resultados destes experimentos podem ser vistos nos cromatogramas M15, M16 e M17, respectivamente.

Melhores separações foram obtidas com diminuição gradativa da polaridade da fase móvel. Todavia, somente com o sistema contendo hexano:etanol:dietilamina (98:2:0,2 v/v/v) foi possível separar completamente os enantiômeros do metoprolol até a linha de base (Cromatograma M17). Os resultados confirmaram que 0,2 % de dietilamina é a quantidade apropriada para diminuir a cauda sem danificar a coluna (Cromatogramas M15 e M16).

Os fabricantes da coluna Chiralcel OD[®] recomendam o emprego de um ácido orgânico, como o ácido acético ou o ácido trifluoroacético quando se trabalha com um fármaco de caráter ácido. Uma base amínica é recomendada quando se tratam de separações enantioméricas de um fármaco com propriedades básicas.

TANG ⁽¹⁹⁸⁾ em trabalho recente apresentou a vantagem do uso simultâneo de um ácido orgânico e de uma base amínica para a separação de enantiômeros de fármacos ácidos, empregando coluna do tipo celulose. Por esse motivo, tentou-se utilizar ácido acético (0,2%) e dietilamina (0,2%) em mistura com hexano e etanol para obter-se a separação enantiomérica do metoprolol.

Os Cromatogramas M18, M19 e M20 apresentam a separação isomérica do metoprolol. Pode-se observar que os picos são mais agudos e não apresentam cauda. Os resultados obtidos com o metoprolol confirmam os efeitos do ácido acético na separação enantiomérica de fármacos básicos, conforme havia sido proposto por TANG ⁽¹⁹⁸⁾.

As vazões empregadas em todos os métodos propostos para a separação dos enantiômeros foram estudadas durante a otimização de cada método. Tomou-se como fator limitante a pressão máxima que a coluna Chiralcel OD[®] suporta sem danificar-se, o que implicou na impossibilidade do emprego de vazão maior do que 0,8 mL/min.

O sistema constituído por coluna Chiralcel OD[®], fase móvel contendo hexano:etanol:dietilamina:ácido acético 40:60:0,2:0,2 v/v/v/v, vazão de 0,8 mL/min. e detecção em 276nm, foi o selecionado para a validação do método.

7.2.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO ATENOLOL

Segundo a literatura algumas tentativas de separação direta dos isômeros do atenolol foram efetuadas utilizando-se coluna do tipo proteína ^(18, 33, 61). Poucos trabalhos foram realizados para a separação enantiomérica do atenolol empregando Chiralcel OD[®] como seletor quiral ^(60, 112).

Nas primeiras etapas, o isopropanol foi utilizado nas concentrações de 30, 40 e 50%, juntamente com hexano (Cromatogramas A2, A3 e A4). Separação razoável foi obtida com sistema de fase móvel constituído por hexano:isopropanol:dietilamina (60:40:0,1 v/v), vazão de 0,5 mL/min. e detecção em 276nm. Embora este sistema tenha apresentado boa seletividade, não apresentou eficiência visto que a separação dos picos não se completava até a linha de base. Além disso, o tempo de análise foi demasiadamente longo, isto é, por volta de 22 minutos (Cromatograma A2).

Recentemente, KIRKLAND e colaboradores ⁽¹¹²⁾ estudaram os efeitos dos álcoois orgânicos nas separações enantioméricas utilizando coluna do tipo Chiralcel OD[®] como modelo. Uma das estratégias simples para separações enantioméricas, utilizando-se coluna do tipo carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil (Chiralcel OD[®]), é empregar etanol ao invés de isopropanol, que é normalmente utilizado com este tipo de coluna ^(13, 198). Observou-se que a polaridade da fase móvel foi aumentada sistematicamente empregando-se de 10% a 40 % de etanol, juntamente com hexano, como eluentes (Cromatogramas A5 a A13).

Pode-se notar que, com o aumento da concentração do etanol, o tempo de retenção dos picos diminui proporcionalmente. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por KIRKLAND e colaboradores ⁽¹¹²⁾.

Na maioria dos casos não houve separação dos isômeros, até a linha de base, que é um dos requisitos para estudos quantitativos (Cromatogramas A5 a A13). Para que o soluto permanecesse por período de tempo maior na coluna, permitindo assim, interações mais íntimas entre isômeros do atenolol e as moléculas quirais da FEQ, foram utilizadas vazões

de 0,7 e 0,5 mL/min. com a fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina (75:25:0,1 v/v). Como pode ser visto nos Cromatogramas A7 e A8 não foi observada nenhuma melhora na resolução dos picos, pelo contrário, o tempo de retenção do isômero (S)-atenolol aumentou de 16, para aproximadamente, 22 min.

Pela visualização dos Cromatogramas A7 e A9, obtidos com 0,1 e 0,2 % de dietilamina, respectivamente, mantendo as outras condições constantes, pode-se observar que com 0,2 % de dietilamina houve diminuição do tempo de retenção. O tempo de retenção do (S)-atenolol com 0,1 e 0,2 % de dietilamina foi de 16,34 min e 13,84 min, respectivamente (Cromatogramas A7 e A9).

ENQUEST e colaboradores ⁽⁶¹⁾ descreveram a primeira separação direta dos isômeros do atenolol utilizando coluna do tipo α_1 -ácido glicoproteína, após derivatização não quiral, com anidrido acético. EGGINGER e colaboradores ⁽⁵⁸⁾ estudaram o processo de acetilização do atenolol para melhorar a sensibilidade e diminuir o fator de capacidade dos picos.

Recentemente, foi observado que os ácidos orgânicos, em pequenas quantidades na fase móvel podem ser essenciais para separações de alguns compostos quirais ácidos e básicos empregando-se colunas do tipo celulose ⁽¹⁹⁸⁾. A partir desta constatação o ácido acético, em baixa concentração, foi empregado na pesquisa do presente projeto, para se obter a separação dos isômeros do atenolol.

Assim, foi desenvolvido um sistema de fase móvel contendo 0,2 % de dietilamina e 0,2 % de ácido acético juntamente com hexano como eluente. Também foi experimentado o etanol em concentrações de 20 e 30 % como modificador orgânico (Cromatogramas A14 e A15). Os dois sistemas deram origem a picos com excelente seletividade e resolução. O tempo de retenção do (S)-atenolol no sistema contendo 20 % de etanol foi um tanto longo, isto é, aproximadamente 25,34 min (Cromatograma A14), já o mesmo sistema com 30% de etanol, nas mesmas condições que o anterior, ou seja, vazão de 1,0 mL/minuto e detecção em 276nm, resultou na mesma seletividade e resolução, porém com diminuição do tempo de retenção, que foi de aproximadamente 13,97 min. Os picos apresentaram-se simétricos e sem caudas (Cromatograma A15).

A ordem de eluição dos picos foi determinada pela injeção individual do (R)-atenolol e do (S)-atenolol no sistema. Os Cromatogramas A16 e A17 confirmam a eluição posterior do (S)-atenolol nessas condições cromatográficas.

O sistema constituído por coluna do tipo Chiralcel OD[®] e fase móvel contendo hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (70:30:0,2:0,2 v/v), vazão de 1,0 mL/minuto e detecção a 276nm, deu origem a separações com os seguintes parâmetros: fator de capacidade $k_1=1,53$, $k_2=4,08$ e seletividade de 2,67.

Estudou-se o efeito do ácido trifluoroacético em substituição ao ácido acético, na mesma proporção. Houve uma melhora moderada no perfil do primeiro pico, como também houve aumento da resolução (Cromatograma A18).

Com base nos perfis dos espectros do atenolol na região do ultravioleta (Figura 21), empregou-se para detecção dos picos o comprimento de onda de 220nm (Cromatograma A19).

O etanol, modificador orgânico adicionado à fase móvel, aumenta sua polaridade e conseqüentemente diminui o tempo de retenção dos picos, sem comprometer a seletividade. A separação apresentada no Cromatograma A20 foi obtida empregando-se 40% de etanol na fase móvel ($k_1=0,4$, $k_2=1,6$, $\alpha=4,2$).

Devido às limitações da pressão e do valor do fator de capacidade do R-atenolol, não foi possível aumentar a vazão e a polaridade da fase móvel.

Com a finalidade de se verificar a interferência dos excipientes foram injetadas duas amostras de placebo. Os Cromatogramas A22 e A23 comprovam que não houve interferência dos excipientes na análise dos enantiômeros do atenolol.

O sistema constituído por coluna Chiralcel OD[®] e fase móvel contendo hexano etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v), vazão de 1,0 mL/min. e detecção em 276, foi o selecionado para a validação do método.

7.2.4 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO PINDOLOL

Vários métodos indiretos foram publicados sobre a separação isomérica do pindolol empregando a pré-derivatização dos isômeros. Poucos trabalhos, no entanto, foram realizados pela separação direta dos enantiômeros do pindolol utilizando FEQs ^(18, 33, 40, 60, 117, 227). O problema principal com a separação isomérica deste composto é o tempo de análise, especialmente, o tempo de retenção do isômero (S)-pindolol. Até mesmo no sistema sugerido pelos fabricantes da coluna Chiralcel OD[®], o tempo de retenção para a eluição dos isômeros é de 50 min ⁽⁴⁶⁾. No trabalho anterior desenvolvido por CHO e colaboradores ⁽⁴⁰⁾, a separação do R- e S-pindolol foi obtida com tempo superior a 45min.

Com base nos dados fornecidos pelo próprio fabricante da coluna concluiu-se que o R-pindolol foi eluído antes do S-pindolol, quando se utiliza coluna Chiralcel OD[®] com sistema de fase móvel em modo normal. Para otimizar o tempo de análise, foram realizadas experiências empregando-se 30% de isopropanol em hexano e vazão de 1,0 mL/min. (Cromatograma P1). As formas dos picos foram sensivelmente melhoradas quando adicionou-se 0,1% de dietilamina na fase móvel. Devido ao limite de pressão da coluna, a vazão foi mantida a 0,9 mL/min.

A separação completa foi obtida utilizando-se o sistema, hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1, v/v) com vazão de 0,9 mL/min. O tempo de análise foi de aproximadamente 25 min. (Cromatograma P2).

Mesmo assim, houve pouca melhora no formato dos picos, especialmente no do (S)-pindolol. Aumentou-se a concentração do isopropanol para 40% visando promover a competição entre o soluto e o modificador orgânico. Desta maneira, as ligações entre a FEQ e o soluto seriam prejudicadas pela alta concentração de isopropanol na fase móvel (Cromatograma P3). Este sistema não propiciou nenhuma melhora no formato ou na simetria dos picos, além do que, o tempo de retenção do (S)-pindolol aumentou drasticamente, isto é, para 45,28 min.

O etanol foi testado, juntamente com o isopropanol, como modificador orgânico. O sistema foi constituído por hexano:isopropanol:etanol:dietilamina (80:10:10:0,1, v/v). Esta fase móvel, além de aumentar o tempo de retenção dos picos, não apresentou melhora na simetria dos picos. O tempo de retenção obtido, em torno de 64,91 min., é inviável para qualquer tipo de análise quantitativa (Cromatograma P4).

Pela visualização dos Cromatogramas P1, P2, P3 e P4 observa-se que a dietilamina, em concentrações superiores a 0,1 %, não diminui a cauda dos picos. Provavelmente, a dietilamina exerça somente a função de diminuir o tempo de análise.

Com base nos resultados obtidos com o isopropanol, como modificador orgânico, empregou-se 5,0% de etanol juntamente com 0,1 % de dietilamina na fase móvel. Nestas condições, a eluição dos enantiômeros do pindolol não foi visualizada, mesmo em tempo superior a 60 min. (Cromatograma P5).

O sistema constituído por hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,1 v/v), com vazão de 1,0 mL/min. e detecção em 254nm, deu origem a uma separação com excelente seletividade e resolução (Cromatograma P6). O pico mais retido, o (S)-pindolol, foi eluído em 36,64 min., apresentando excelente simetria. As limitações da coluna, com relação à pressão permitida, impediram o aumento da concentração do etanol.

Pode-se notar que o comprimento de onda empregado na análise possui grande efeito sobre o formato e simetria dos picos. Por esta razão, é importante escolhê-lo cuidadosamente, considerando a melhor e maior detecção para as quais será empregado.

Embora a separação enantiomérica do pindolol tenha sido efetuada utilizando-se coluna do tipo Chiralcel OD[®], o tempo de retenção mostrou a inviabilidade do emprego em análise enantiomérica de rotina.

Outras tentativas foram efetuadas para a separação enantiomérica do pindolol empregando-se a mesma coluna Chiralcel OD[®]. Nos Cromatogramas P8, P9 e P10 podem ser vistas as separações parciais dos isômeros do pindolol. Pode-se observar que não houve diminuição da cauda dos picos com o aumento da concentração de dietilamina. A detecção, realizada em 276nm, aumentou a interferência da fase móvel e a instabilidade da linha de base.

Foram também testadas as combinações de ácido acético e de dietilamina, nas mesmas concentrações empregadas para a separação do atenolol e do metoprolol, com o intuito de separar os isômeros do pindolol. No entanto, apesar dos perfis dos picos terem melhorados, os tempos de retenção não foram apropriados para a padronização do método (Cromatogramas P11, P12, P13 e P14).

Recentemente, PIRKLE e colaboradores ⁽¹⁶⁵⁾ idealizaram uma coluna especialmente preparada para a separação enantiomérica de β -bloqueadores, sem necessidade de derivatização prévia dos fármacos em questão. Novas tentativas foram feitas empregando-se colunas do tipo (S, S)- α -Burke 2[®], desenvolvidas por BURKE III ^(165, 219) e comercializadas pela empresa *Regis Technologies Inc. USA*.

PETERSEN e colaboradores ⁽¹⁶⁰⁾ empregaram coluna do tipo (R, R)- α -Burke 1[®] para a separação enantiomérica de uma série de β -bloqueadores. Os resultados apresentados mostraram que esta coluna foi capaz de separar os isômeros do pindolol. O enantiômero S-pindolol foi eluído primeiro, seguido do R-pindolol, confirmando o fato de que o enantiômero R apresenta ligações mais fortes com a fase estacionária quiral. No entanto, os tempos de retenção dos picos, apresentados no trabalho citado, eram muito longos (aproximadamente 60 min.), impossibilitando assim o emprego em análises de rotina ⁽¹⁶⁰⁾.

PIRKLE e colaboradores ⁽¹⁶⁵⁾ relataram a separação dos enantiômeros do pindolol empregando coluna do tipo (R, R)- α -Burke 1[®]. O tempo de análise a 21°C foi de cerca de 20 min. com seletividade de 1,30. Foi observado que um decréscimo na temperatura melhorava a seletividade sem comprometer a resolução dos picos. O tempo de análise foi de cerca de 11-12 min a -24°C. No entanto, as condições especiais (-24°C) empregadas pelos autores dificultam seu uso em laboratórios de análise.

Algumas tentativas foram realizadas durante a parte experimental de nosso projeto de pesquisa empregando-se a coluna (S, S)- α -Burke 2[®]. Os Cromatogramas P15 e P16 mostram separações enantioméricas do pindolol empregando-se esta coluna e fase móvel constituída por diclorometano:etanol (85:15 v/v) com acetato de amônia 20 mM. No entanto, o sistema composto por esta fase móvel apresentou problemas com relação à estabilização da linha de base do cromatograma e do tempo de retenção do segundo pico, que foi relativamente longo (Cromatogramas P15 e P16). Os solutos não foram eluídos na ausência de acetato de amônio. Foi observado que a presença de íons de amônio era essencial para ocorrer a separação, como pode ser observado no Cromatograma P17. A molécula do pindolol apresenta propriedades básicas, portanto, liga-se fortemente à fase estacionária. Por esta razão os picos não foram eluídos antes de 60-70 minutos (Cromatograma P17).

PIRKLE e colaboradores ^(38, 165) aconselham o emprego de um protonizador para diminuir a basicidade da molécula do pindolol. Esta dificuldade pode ser superada pela derivatização transitória do grupo amino da molécula. O acetato de amônio age promovendo protonização reversível da molécula e fornece a ligação necessária para o reconhecimento quiral.

Trabalhos diversos comprovaram as vantagens do uso de acetonitrila com coluna C18 como também com colunas derivadas de dinitrobenzoila. Ensaios foram realizados para separação enantiomérica do pindolol em FEQ do tipo α -Burke 2[®] e acetonitrila como eluente, ao invés de diclorometano.

Os Cromatogramas de P18 a P23 mostram separações enantioméricas do pindolol nessas condições de análise. Pelo estudo comparativo dos Cromatogramas P15 e P18, pode-se concluir que a acetonitrila retarda a eluição dos isômeros. Os grupos dicloro são os responsáveis pela polaridade do solvente e conseqüentemente, promovem o deslocamento dos enantiômeros nos sítios de ligação da coluna. Observou-se também que um acréscimo na polaridade da fase móvel, em virtude do aumento da concentração do modificador polar, etanol por exemplo, promove diminuição no tempo de retenção. No entanto, com fase móvel extremamente polar houve diminuição da área dos picos obtidos, mesmo injetando-se a mesma concentração, comprometendo assim, o nível de detecção do soluto (Cromatograma P20).

Após vários estudos preliminares, foram estabelecidas as condições ideais para separação dos enantiômeros do pindolol com tempo de análise mais curto. A detecção no UV foi otimizada em 220nm e a vazão em 1,3 mL/min. (Cromatograma P22)

Um sistema constituído por coluna (S, S)- α -Burke 2[®], fase móvel contendo acetonitrila:etanol (50:50 v/v), acrescido de acetato de amônio 21,62 mM, a uma vazão de 1,3 mL/min. e detecção em 220nm, foi considerado apropriado para a validação do método para determinação dos enantiômeros do pindolol nas amostras de preparações farmacêuticas.

7.2.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO BETAXOLOL

Os estudos preliminares para a separação dos isômeros do betaxolol foram realizados empregando-se a coluna Chiralcel OD[®]. A fase móvel foi constituída por várias proporções e combinações de hexano, isopropanol e etanol, somados a quantidades inferiores a 1% de dietilamina e/ou ácido acético.

Após separação do metoprolol, obtida utilizando-se sistema constituído por hexano modificado com 30 % de isopropanol e 0,1 % de dietilamina, utilizou-se o mesmo sistema para separação enantiomérica do betaxolol, pois ambos são aminoálcoois que apresentam similaridade estrutural, com exceção da presença de um grupamento *p*-ciclopropil na parte metoxietil, no caso do betaxolol (Quadro 1).

Os isômeros de betaxolol foram separados com seletividade de 2,07 (Cromatograma B1) empregando-se sistema de solventes constituído por hexano:isopropanol (70:30) v/v. Com base nos dados apresentados pelo fabricante da coluna, provavelmente o (R)-betaxolol foi eluído primeiro com tempo de retenção de 4,62 min ⁽⁴⁶⁾. O (S)-isômero foi eluído com 6,66 min. (Cromatograma B1). Não foi possível confirmar a ordem de eluição dos enantiômeros devido falta de isômeros puros em forma isolada ou detector apropriado como dicroísmo circular empregado com tal finalidade.

Outros sistemas eluentes também foram testados como hexano:isopropanol:dietilamina (60:40:0,1) v/v. (Cromatograma B2) e hexano:isopropanol:etanol:dietilamina (90:10:10:0,1 v/v/v) (Cromatograma B3). Em ambos os casos não houve separação completa, apesar de que tanto o etanol quanto o isopropanol, empregados em baixas concentrações (10%) como modificadores orgânicos, tenham diminuído consideravelmente o tempo de retenção. O (S)-betaxolol apresentou tempo de retenção de 5,98 min. (Cromatograma B3).

Tentativas empregando ácido acético na fase móvel foram efetuadas com o intuito de se obter a separação dos enantiômeros do betaxolol na forma de par iônico. O princípio desta técnica foi aplicado com sucesso nas separações dos enantiômeros do atenolol e do nadolol.

O sistema constituído por coluna do tipo Chiralcel OD[®] e fase móvel contendo hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v), vazão de 1,0 mL/min. e detecção em 276nm, foi considerado apropriado para a validação do método para determinação dos enantiômeros do betaxolol nas amostras de preparações farmacêuticas. Este sistema deu origem à separação com os seguintes parâmetros: fator de capacidade $k_1=0,70$, $k_2=1,45$ e seletividade de 2,07.

7.2.6 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO NADOLOL

O nadolol, apesar de possuir três carbonos quirais, apresenta apenas dois centros quirais, pois as hidroxilas do carbono 2-3 são fixas na configuração *cis*, permitindo um total de quatro enantiômeros. Os isômeros do nadolol foram separados empregando-se a coluna Chiralcel OD[®] e detecção no UV em 276nm.

Verificou-se na literatura que os dois primeiros picos são os isômeros (RSR)-nadolol e (RRS)-nadolol que são as formas dextrógiras (+) ⁽²⁾. O terceiro pico seria o (SRS)-nadolol que também é dextrógira. O quarto, corresponderia ao (SSR)-nadolol que é levógiro (-) quando se emprega coluna do tipo Chiralcel OD[®]. Esta sequência de eluição foi obtida por ABOUL-ENEIN e colaboradores ⁽²⁾ usando detector óptico Shodex OS-1, com o qual é possível identificar as rotações ópticas dos enantiômeros. Os autores verificaram que não ocorrem alterações na ordem de eluição quando se empregam fases móveis de mesma constituição. No entanto, os autores do referido trabalho não apresentaram separação pela injeção simultânea dos quatro enantiômeros na forma racêmica. Resultados semelhantes foram obtidos por McCARTHY ⁽¹³⁰⁾, utilizando coluna do tipo Chiralpek AD[®] e fase móvel contendo hexano:etanol:dietilamina (80:20:0,3 v/v) com vazão de 1,2 mL/min. Neste caso, também o isômero RRS foi o primeiro a eluir e o isômero RSS, o último. Os autores deste trabalho obtiveram separação enantiomérica pela injeção simultânea dos quatro isômeros na forma racêmica.

ABOUL-ENEIN e colaboradores ⁽²⁾ empregaram fase móvel constituída por hexano, etanol e dietilamina. O sistema de solventes utilizado no presente trabalho de pesquisa foi hexano, etanol e dietilamina com 0,2 % de ácido acético. Apesar de se ter utilizado uma fase móvel semelhante, a separação dos isômeros nos dois casos, foi bem diferente. A presença do ácido acético pode alterar a ordem de eluição dos enantiômeros.

Em busca de um sistema de fases móveis simples, de preferência binárias ou ternárias, foram realizados testes empregando-se um sistema constituído por hexano e isopropanol, com ou sem dietilamina. Para facilitar a apresentação dos resultados, denominar-se-ão os quatro picos do nadolol como 1, 2, 3 e 4, na respectiva ordem de eluição.

Em todos os casos houve separação entre os picos 2 e 3. O sistema contendo hexano:isopropanol (70:30 v/v) deu origem à separação dos picos 3 e 4 enquanto que os picos 1 e 2 eluíram juntos, mas separados dos picos 3 e 4 (Cromatograma N1). Um acréscimo na polaridade pelo aumento de 40 % de isopropanol, resultou na perda completa da seletividade dos picos 3 e 4. Ao mesmo tempo, não houve separação dos picos 1 e 2 (Cromatograma N2).

Por esse motivo, novas tentativas foram direcionadas na diminuição da concentração do modificador orgânico e da polaridade da fase móvel. A fase móvel constituída por hexano:isopropanol:etanol:dietilamina (80:10:10:0,1 v/v/v/v) também, deu origem à separação parcial dos picos 3 e 4, não ocorrendo a separação dos picos 1 e 2 (Cromatograma N3).

Com base nos resultados obtidos na separação dos isômeros do atenolol, outros experimentos foram efetuados com a mesma fase móvel, constituída por hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (70:30:0,2:0,2 v/v/v/v) para separar os isômeros do nadolol. Este sistema permitiu a separação parcial dos picos 1 e 2, entretanto não houve separação dos picos 3 e 4 (Cromatograma N4). Observou-se que o aumento na polaridade de fase móvel, devido à presença do ácido acético, resultou na diminuição do tempo de retenção, mas não na eficiência da separação destes picos.

O etanol a 20 % com 0,1 % de dietilamina permitiu a separação dos picos 3 e 4 (Cromatograma N5). A partir daí foram estudados os efeitos da dietilamina e do ácido acético, mantendo-se constantes os outros parâmetros (Cromatogramas N6, N7 e N8).

Pelos resultados obtidos, utilizando-se hexano:etanol (80:20 v/v) com três diferentes proporções de dietilamina e ácido acético, 0,2:0,2 ; 0,2:0,3 ; 0,3:0,2, observou-se que apenas o sistema contendo hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (80:20:0,2:0,2 v/v) foi capaz de separar parcialmente os quatro isômeros do nadolol (Cromatograma N6). A partir daí foram fixadas as concentrações de dietilamina e de ácido acético em 0,2 %.

Na etapa seguinte, a concentração de etanol foi reduzida para 15 %. Os picos 3 e 4 perderam parcialmente a seletividade (Cromatograma N9). Mantendo-se o sistema de eluição hexano:etanol:dietilamina:ácido acético 85:15:0,2:0,2 v/v e alterando-se a vazão da fase móvel de 1,0 mL/min para 0,7 e 0,8 mL/min, (Cromatograma N10 e N11), concluiu-se que a vazão de 0,8 mL/min foi a que melhor favorecia a separação.

O Cromatograma N12 apresenta a separação completa dos quatro isômeros do nadolol empregando fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (87:13:0,2:0,2 v/v) em vazão de 0,8 mL/minuto. A detecção foi efetuada a 276nm. Os quatro picos do nadolol apresentaram a seletividade desejada e eluíram com os seguintes tempos de retenção: 15,18, 17,80, 30,46 e 33,68 min, respectivamente.

Qualquer decréscimo na polaridade da fase móvel conduziu a uma perda de resolução para os picos 3 e 4, mesmo quando foi utilizado fluxo de 0,8 mL/min (Cromatogramas N13 e N14).

Nas colunas do tipo CHIRALCEL OD[®] os β -bloqueadores (aminoálcoois) podem ser separados com maior resolução por se transformarem em grupos amínicos ionizados. Assim, é indicada a adição de 0,2% de ácido acético e de dietilamina na fase móvel com intuito de se obterem melhores separações. O ácido acético protoniza-se o grupo amino dos aminoálcoois e a dietilamina age suprimindo as interações do composto com os grupos silanóis da coluna. Esse fenômeno pode ser comparado à separação por competição entre pares iônicos. Os resultados obtidos com etanol, como modificador orgânico, podem ser justificados com base no fato de que o par iônico apresenta melhor solubilidade na fase móvel contendo este solvente ^(198, 199).

Empregando-se coluna Chiralcel OD[®] com fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (87:13:0,2:0,2 v/v), vazão de 0,8 mL/min e detecção em 276nm, obteve-se a separação completa dos quatro enantiômeros do nadolol em única etapa, visto que as separações resultantes desse sistema apresentaram os seguintes parâmetros: fator de capacidade $k_1=3,40$, $k_2=4,16$, $k_3=7,73$, $k_4=8,76$ e seletividade de 1,22 (entre os picos 1 e 2), 1,12 (entre os picos 3 e 4), 1,88 (entre os picos 2 e 3).

7.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DOS ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES

7.3.1 SEPARAÇÃO UTILIZANDO COLUNA DO TIPO CHIRALCEL OD[®]

O trabalho pioneiro na separação dos enantiômeros de profenos foi realizado por OKAMOTO e colaboradores ⁽¹⁴⁹⁾. Na maioria dos casos foi utilizada a técnica de pré-derivatização do grupo carboxila, especificamente no caso do ibuprofeno. Com base neste trabalho empregou-se uma coluna do tipo Chiralcel OD[®] para efetuar-se a separação enantiomérica do ibuprofeno e do flurbiprofeno.

É bem conhecido o fato de que as interações fracas (pontes de hidrogênio) são favorecidas em ambiente apolar. Assim, misturas de álcoois anidros, com baixa polaridade, foram utilizadas juntamente com hexano para as separações de β -bloqueadores quando se utiliza coluna do tipo Chiralcel OD[®].

TACHIBANA e colaboradores ⁽¹⁹⁶⁾ em trabalho recente descreveram a necessidade da presença de ácidos como o acético ou o trifluoroacético, em pequenas quantidade na fase móvel, quando se emprega FEQ do tipo celulose tris-3,5-dimetilfenil para obter-se a separação enantiomérica. De acordo com os autores é importante controlar o comportamento iônico do analito para obter-se uma boa separação enantiomérica. No caso de empregar-se fase derivada de polissacarídeos não é necessária a interação iônica para que haja qualquer tipo de reconhecimento quiral, quando trata-se de uma molécula com característica de ácido fraco ⁽¹⁹⁶⁾.

Os analitos portadores de carga elétrica reduzem consideravelmente a interação com a FEQ, presumivelmente devido a solvatação do analito ionizado, que inibe as interações diretas do analito com a FEQ. Eventualmente, pode ocorrer separação parcial dos enantiômeros ⁽¹⁹⁶⁾. Para evitar este tipo de problema e por outro lado, diminuir as ligações não desejadas do soluto carregado, é aconselhável tentar-se a separação dos isômeros na forma não dissociada do analito ^(196, 198).

A presença de ácido acético na fase móvel favorece o abaixamento do pH do meio. Assim, os íons do soluto, na forma de ácidos livres, formam complexos com ligações frágeis permitindo que o soluto seja removido da coluna com maior facilidade. Na análise de ácidos carboxílicos, como o ibuprofeno e o flurbiprofeno, o ácido acético ou o ácido trifluoroacético, são adicionados à fase móvel para manter o ácido carboxílico do analito na forma não ionizada. Se o ácido carboxílico não for neutralizado, o analito pode estar presente numa forma neutra, parcialmente ionizada, ou totalmente ionizada, dependendo do seu pKa. Na forma iônica, o ácido interage com os grupos dos silanóis (interação não quiral) pelas pontes de hidrogênio, assim provocando uma interação desfavorável, que conduz à obtenção de picos com caudas ⁽¹⁹⁹⁾.

As separações parciais dos enantiômeros do ibuprofeno e do flurbiprofeno foram obtidas empregando FEQ Chiralcel OD[®]. A separação parcial dos isômeros comprova que houve reconhecimento estereoespecífico entre o FEQ e os solutos. No entanto, a força e o número de interações não foram suficientes para que ocorresse a separação completa dos enantiômeros. TACHIBANA e colaboradores ⁽¹⁹⁶⁾ apresentam a separação enantiomérica do ibuprofeno e do flurbiprofeno empregando FEQ derivada de amilose em fase reversa e fase móvel constituída de tampão fosfato pH 2,0 e acetonitrila. O pH da fase móvel empregada neste caso, foi bem menor do que 5,39 e 4,2 que correspondem ao pKa do ibuprofeno e do flurbiprofeno, respectivamente. Esta situação garante que o ibuprofeno e o flurbiprofeno permaneçam na forma não dissociada possibilitando maior número de interações possíveis entre a FEQ e os solutos.

7.3.2 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES UTILIZANDO COLUNA DO TIPO CHIRADEX[®]

As fases estacionárias quirais derivadas de ésteres de D-celulose com vários grupos terminais tem sido apresentadas como eficientes para a separação enantiomérica de antiinflamatórios não-esteróides. A coluna deste tipo mais usada é a de β -ciclodextrina (Chiradex[®] e Cyclobond I[®], entre outras). São constituídos por moléculas macrocíclicas que contêm sete unidades de glucopiranoose em formato de “cone” vazio, com ambos os lados abertos. A cavidade interior é relativamente hidrofóbica e a camada externa hidrofílica. Devido a rigidez da cavidade da β -ciclodextrina, somente as moléculas de tamanho apropriado “encaixam-se” nas cavidades vazias. Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura, propondo a separação enantiomérica de antiinflamatórios não-esteróides utilizando coluna do tipo β -ciclodextrina ^(16, 68).

Entre os fatores que controlam a separação enantiomérica nas colunas do tipo β -ciclodextrina (Chiradex[®]) podem ser citados: a diferença na constante de estabilidade das ligações dos complexos de β -ciclodextrina, a diferença na adsorção dos complexos de β -ciclodextrina na superfície de fase estacionária e a diferença na adsorção das moléculas dos solutos livres na camada de β -ciclodextrina, ou seja na superfície da fase estacionária. Somente as moléculas do soluto que podem ser encaixadas dentro da cavidade quiral da β -ciclodextrina estabelecendo interação “íntima” entre a molécula e a camada interior da cavidade, é que podem formar complexos estáveis de inclusão. Se o tamanho do soluto for menor ou maior do que a cavidade, estabelece-se uma interação fraca ou então, as moléculas não interagem com a coluna, não ocorre a separação desejada.

A separação se processa pela inclusão e posicionamento do analito na abertura da cavidade da ciclodextrina, onde ocorrem as pontes de pontes de hidrogênio.

Em coluna do tipo ciclodextrina, o reconhecimento quiral é característico para as substâncias que tem um grupo hidrofóbico na molécula. A cavidade da ciclodextrina, apesar de ser uma cavidade hidrofóbica, devido à presença de oxigênio glicosídico, não é totalmente apolar. Assim, aquelas moléculas que têm um grupo hidrofóbico grande, como no caso do ibuprofeno e do flurbiprofeno, é que podem formar um complexo de inclusão forte e conseqüentemente permitir o reconhecimento quiral. Outro fenômeno que ocorre simultaneamente, durante a separação quiral, é a interação por pontes de hidrogênio entre os grupos funcionais polares do soluto e os grupos hidroxila da ciclodextrina ⁽¹⁶⁾.

Os mecanismos envolvidos na separação descrita são críticos, embora o processo de encaixe pareça simples. No entanto, existem vários fatores que influenciam este processo, como por exemplo a relação entre o tamanho da cavidade da ciclodextrina e o tamanho da molécula, assim como a orientação e a configuração espacial durante o encaixe na cavidade.

Devido ao fato de que o ibuprofeno e o flurbiprofeno são ácidos fracos, a retenção destes solutos e a seletividade quiral podem ser influenciadas pelo tipo e pela concentração dos modificadores orgânicos, pelo pH do meio e pela concentração de trietilamina, que diminui as caudas dos picos ⁽⁶⁸⁾. Por esta razão, na separação do ibuprofeno e do flurbiprofeno foram testados vários sistemas utilizando coluna do tipo Chiradex[®].

Neste trabalho foram empregados, para separação dos enantiômeros do ibuprofeno e do flurbiprofeno, sistemas de fase móvel relativamente polares. Basicamente foi utilizado um sistema constituído por acetonitrila, com modificadores orgânicos que “competem” com o soluto para efetuar as pontes de ligações com a β -ciclodextrina. É o caso, por exemplo, do metanol.

A polaridade dos eluentes foi selecionada levando-se em consideração a interação entre o soluto e o seletor quiral localizado na FEQ, sem prejudicar a solubilidade dos solutos. Assim por exemplo, a interação eletrostática e hidrofóbica entre o seletor e o soluto, na forma iônica, é mais efetiva quando o composto é solubilizado em eluente polar, como água e acetonitrila ⁽⁷⁷⁾.

O mecanismo de separação é baseado nas interações com as hidroxilas da ciclodextrina e em interações dipolares. A quantidade de metanol exerce grande influência sobre as separações quirais. Esse modificador orgânico pode diminuir a força da complexação do fármaco com a β -ciclodextrina, “competindo” com o fármaco pela formação de pontes de hidrogênio com as hidroxilas da ciclodextrina.

Na presente pesquisa ficou demonstrado experimentalmente que o metanol apresenta papel importante no deslocamento do soluto pela coluna. Com o aumento da concentração de metanol na fase móvel, observou-se que diminuição nos tempos de retenção. Esses resultados estão de acordo com o constatado por FARKAS e colaboradores⁽⁶⁸⁾.

A presença do ácido acético na fase móvel pode ser justificada pelo fato de que, o este ácido, em concentrações baixas, permite intensificar o reconhecimento quiral do ibuprofeno e do flurbiprofeno, pois pode controlar o grau de ionização dos fármacos. Os dois fármacos, na forma iônica / dissociada, são relativamente mais retidos na coluna do que quando se encontram na forma não dissociada. Por esta razão, foi utilizado um ácido fraco, como o ácido acético, para diminuir o tempo de retenção dos solutos.

Estudos preliminares e a revisão da literatura mostraram que a acetonitrila é um bom eluente para a separação enantiomérica do ibuprofeno e do flurbiprofeno, utilizando-se β -ciclodextrina como fase estacionária quiral^(68, 79, 80, 208). A trietilamina, em baixas concentrações (< 1,0%), foi utilizada para diminuir as caudas dos picos⁽⁴⁵⁾.

GILAR e colaboradores⁽⁸²⁾ observaram a formação de complexos de inclusão entre o soluto e a cavidade de β -ciclodextrina e demonstraram que os grupos silanol da sílica são fatores importantes na separação dos antiinflamatórios não-esteróides.

GILAR e colaboradores⁽⁸²⁾ encontraram diferenças substanciais entre duas colunas de β -ciclodextrina fabricadas por duas empresas diferentes, a Cyclobond I[®] (Astec) e a Chiradex[®] (Merck). Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho confirmaram este fato. Assim, não foi possível reproduzir os resultados obtidos anteriormente com a coluna cyclobond I[®], ao empregar-se a coluna Chiradex[®].

7.3.3 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES UTILIZANDO COLUNA DO TIPO α -BURKE 2[®]

A coluna α -Burke 2[®] é constituída por um derivado dinitrobenzoil (DNB), que originalmente foi desenvolvida por PIRKLE ^(38, 165, 219), especificamente para a separação enantiomérica de β -bloqueadores. Este tipo de coluna foi empregado, na presente pesquisa, para obter-se a separação enantiomérica do ibuprofeno e do flurbiprofeno.

O reconhecimento quiral pela coluna do tipo α -Burke 2[®] depende dos requisitos conformacionais do soluto e da fase estacionária quiral. Em relação ao ibuprofeno e ao flurbiprofeno, três interações podem ocorrer simultaneamente: (1) pontes de hidrogênio entre o grupo hidroxílico do ácido carboxílico dos antiinflamatórios não-esteróides e o grupo carbonila do 3,5-dinitrobenzoiol (3,5-DNB) carboxamido da fase estacionária quiral; (2) interação estérica entre os grupos arilalquílicos do ibuprofeno e do flurbiprofeno e a fase estacionária quiral; (3) interações π - π doador-aceptor entre o anel fenílico dos antiinflamatórios não-esteróides e os grupos 3,5-DNB, pois o ibuprofeno e o flurbiprofeno são π - π doadores e a coluna α -Burke 2[®] apresenta a propriedade de aceitar ligações π - π .

Um aumento gradativo na polaridade da fase móvel, devido ao aumento da quantidade do modificador orgânico, como o álcool etílico por exemplo, provocou diminuição no tempo de retenção do primeiro pico, mas ainda assim não foi possível a separação enantiomérica. O valor do pKa do ibuprofeno é de 5,39 ⁽¹³⁶⁾ e do flurbiprofeno é de 4,20 ⁽¹⁵⁸⁾. Os ensaios foram realizados em pH acima e abaixo desses valores.

Devido ao fato de que o ibuprofeno é um ácido fraco, a retenção de seus enantiômeros e a seletividade quiral são influenciadas pelo tipo e concentração do modificador polar, do pH, da concentração do tampão, da adição de trietilamina e também da temperatura do eluente.

7.3.4 SEPARAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES UTILIZANDO COLUNA DO TIPO (S, S)-WHELK-O 1[®]

A FEQ o Whelk-O 1[®], foi escolhida para separação enantiomérica do ibuprofeno e do flurbiprofeno. Esta fase quiral derivada de dinítrobenzoil é uma coluna importante na cromatografia líquida de alta eficiência para separação de ampla variedade de compostos farmacêuticos. A FEQ tem apresentado ser útil para separação enantiomérica dos antiinflamatórios não-esteróides sem necessidade de derivatização previa dos solutos ^(38, 110, 170, 219, 221). A referida FEQ apresentou-se ser eficiente para resolução isomérica dos compostos contendo grupo π -aromático juntamente com um grupo aceptor de ponte de hidrogênio localizado próximo o centro estereogênico ⁽²²¹⁾.

Tipicamente, a fase móvel, em fase normal, contendo quantidades pequenas de ácido acético é empregada para separação enantiomérica de ácidos carboxílicos quando se utiliza esta FEQ. Embora já tem sido utilizado sal como acetato de amônio para mesma finalidade, isto é para melhora a simetria dos cromatogramas. O uso de ácidos fortes como trifluoroacético não é recomendada pelo fabricante da FEQ, para evitar danos estruturais irreversíveis a fase quiral ⁽³⁸⁾.

São dois os caminhos para promover a ponte de hidrogênio entre antiinflamatórios não-esteróides com grupo carboxílico na sua estrutura e o Whelk-O 1[®], a derivatização de ácido carboxílico ou analisar o soluto na forma não dissociada. A opção posterior é mais pratica e fácil e pode ser alcançada pela adição de um ácido, como por exemplo, acético, na fase eluente com intuito de diminuir seu pH abaixar do valor do pKa do soluto ⁽¹¹⁰⁾.

7.3.5 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO IBUPROFENO

A separação enantiomérica do ibuprofeno foi realizada utilizando-se coluna do tipo Chiralcel OD[®] e fase móvel constituída por hexano com modificadores orgânicos, tais como isopropanol, etanol ou metanol, juntamente com ácido acético e ácido trifluoroacético.

O ácido acético foi utilizado para proceder-se a separação isomérica do ibuprofeno na forma não dissociada. Não foi possível separar os isômeros com 0,2% de ácido acético (Cromatograma IB1). É bem provável que o ácido acético, sendo um ácido fraco, não tenha ionizado completamente os isômeros do ibuprofeno. Assim, o ácido trifluoroacético foi empregado em concentrações baixas, 0,05 e 0,1% (Cromatogramas IB2 e IB3), respectivamente. A separação completa dos enantiômeros do ibuprofeno não foi atingida com um sistema de solventes constituído por hexano:isopropanol: ácido trifluoroacético (100:01:0,1 v/v/v) (Cromatograma IB3). Embora, a absorção máxima do ibuprofeno seja em 225nm (Figura 23), as detecções foram efetuadas em 254nm para evitar a instabilidade da linha de base.

O metanol foi utilizado como modificador orgânico alternativo, em baixas concentrações. Pode-se observar no Cromatograma IB4 que, com o aumento da polaridade da fase móvel, os picos perderam a seletividade, como também a resolução. Empregando-se o etanol como modificador orgânico em baixa concentração (1,0 %), não foi possível obter-se a separação completa dos picos (Cromatogramas IB5, IB6, IB7).

Em pesquisas anteriores realizadas por SANTORO e colaboradores ^(40, 177), foi indicada a utilização de coluna do tipo β -ciclodextrina para separação enantiomérica do ibuprofeno e do flurbiprofeno.

Foi constatado por vários pesquisadores, que a acetonitrila é um eluente útil quando se utilizam colunas do tipo β -ciclodextrina nas separações. O metanol foi utilizado como modificador orgânico, juntamente com ácido acético e trietilamina, em baixas concentrações.

No Cromatograma IB10, observa-se que o pico da fase móvel aparece com tempo de retenção de aproximadamente de 2,59 min, o que pode interferir com um suposto pico do R(-)-ibuprofeno. Devido a falta do enantiômero puro do R-ibuprofeno, não foi possível a confirmação destes resultados.

O pico do S(+)-ibuprofeno pode ser visto no Cromatograma IB9. Um pico menor aparece invariavelmente antes de pico principal do S(+)-ibuprofeno. É pouco provável que este pico menor seja seu produto de degradação, visto que todas as soluções e as fases móveis foram preparadas no mesmo dia. Este pico não se manifestou quando o ibuprofeno racêmico foi injetado

Ensaio preliminares para a separação enantiomérica do ibuprofeno foram efetuados utilizando-se o composto na forma ionizada, isto é, com pH da fase móvel acima de 5,39 (Cromatogramas IB15, IB16, IB17, IB18 e IB19). Com coluna α -Burke 2[®] empregando-se a fase móvel constituída por acetonitrila:etanol (90:10 v/v) com 5 mM de acetato de amônio, não foi possível separar os enantiômeros do ibuprofeno. Os dois enantiômeros foram eluídos juntos (Cromatograma IB15). Este fato foi comprovado pela injeção da solução do isômero S-ibuprofeno isoladamente (Cromatograma IB16).

Por esta razão passou-se para a utilização do ácido acético ao invés do acetato de amônio. Com o sistema contendo acetonitrila:etanol:ácido acético (50:50:0,3 v/v/v) e vazão de 1,0 mL/min., não foi possível a separação dos enantiômeros (Cromatogramas IB17, IB18).

Outras tentativas foram efetuadas para a separação enantiomérica do ibuprofeno na forma não ionizada. Utilizando-se a mesma coluna, empregou-se um sistema de fase móvel contendo hexano:etanol:ácido acético (95:05:0,3 v/v/v) com pH 4,0. Os Cromatogramas IB20, IB21 e IB22 referem-se ao R,S-ibuprofeno na concentração de 160,0 µg/mL e ao S-ibuprofeno na concentração de 80,0 µg/mL. A mistura hexano:etanol foi utilizada para solubilização e preparação das amostras. Como pode ser observado pelos cromatogramas, não houve separação dos enantiômeros.

A polaridade da fase móvel foi diminuída com adição de isopropanol. Os Cromatogramas IB23 (R,S-ibuprofeno 160,0 µg/mL) e IB24 (S-ibuprofeno 80,0 µg/mL) mostram que, mesmo após 30 minutos não se obteve a eluição dos enantiômeros do ibuprofeno, utilizando-se a fase móvel constituída por hexano:isopropanol:ácido acético (97:03:0,3 v/v/v).

Os Cromatogramas IB25 e IB26 apresentam separações parciais dos enantiômeros do ibuprofeno, empregando-se a fase móvel constituída por hexano:etanol (97:3 v/v) e vazão de 0,7 mL/min. A molécula foi cromatografada na forma ionizada (pH da fase móvel 6,2). Comparando-se os cromatogramas IB25 e IB26 observa-se que a forma R- foi a que eluiu primeiro, ao contrário do que havia sido observado utilizando-se a coluna do tipo β-ciclodextrina ⁽¹⁶⁾. A eluição dos picos nessa ordem já era esperada, devido ao fato de que a configuração isomérica da FEQ é S, S ^(38, 165, 219). Quando a vazão da fase móvel foi aumentada para 1,0 mL/min, houve perda da seletividade, provavelmente devida à diminuição do tempo de interação entre o soluto e a coluna (Cromatograma IB27).

Empregando-se sistemas constituídos por solventes clássicos (diclorometano:etanol), com esse tipo de coluna, também não foi possível separar os enantiômeros do ibuprofeno (Cromatogramas IB28 e IB29).

BEESON e colaboradores ⁽¹⁶⁾ e FARKAS e colaboradores ⁽⁶⁸⁾ empregaram coluna do tipo β-ciclodextrina (Cyclobond I[®]) para efetuar a separação enantiomérica de alguns antiinflamatórios não-esteróides, entre eles, o ibuprofeno e o flurbiprofeno.

Empregou-se também durante o desenvolvimento da parte experimental uma coluna do tipo β-ciclodextrina (Chiradex[®]) com um sistema de fase móvel constituído por acetonitrila: 5 mM tampão citrato (30:70 v/v) com vazão de 1,2 mL/min. Nestas condições não foi obtida a separação dos enantiômeros do ibuprofeno (Cromatograma IB30).

Utilizando-se a fase móvel constituída por acetonitrila:tampão citrato 70 mM (40:60 v/v) e vazão de 1,2 mL/min., observou-se que apesar da diminuição do tempo de retenção, não houve nenhuma separação dos enantiômeros (Cromatograma IB31). Empregando-se tampão citrato e acetonitrila como eluentes, obtiveram-se os traçados representados nos Cromatogramas IB32 e IB33, respectivamente.

O sistema de fase móvel contendo acetonitrila:água:triethylamina (60:40:0,03 v/v/v), com pH ajustado para 4,0 com ácido acético, foi também utilizado para tentar-se a separação enantiomérica do ibuprofeno. Os picos do ibuprofeno, na forma não ionizada, não foram eluídos mesmo após 70 minutos (Cromatograma IB34).

WENG e colaboradores ⁽²²²⁾ empregaram coluna do tipo Cyclobond I[®] (β -ciclodextrina) para a separação enantiomérica do ibuprofeno. O sistema de fase móvel foi constituído por acetonitrila:água:triethylamina (60:40:0,02 v/v/v); o pH foi ajustado a 4,0 com ácido acético. Os isômeros foram separados na forma não ionizada. O método foi validado para aplicação em amostras biológicas. Mesmo assim, o tempo de análise foi demasiadamente longo (em torno de 25 min).

Os resultados obtidos neste trabalho empregando-se coluna do tipo β -ciclodextrina (Chiradex[®]) confirmaram a diferença na enantiosseletividade das duas colunas (Chiradex[®] e Cyclobond I[®]). WENG e colaboradores ⁽²²²⁾ relataram os mesmos resultados quando os ensaios para a separação enantiomérica do ibuprofeno foram efetuados empregando-se coluna da mesma marca (Chiradex[®]).

Recentemente, uma fase estacionária quiral deriva da de dinitrobenzoil foi desenvolvida inicialmente, objetivando a separação enantiomérica de naproxeno ^(38, 219, 221). Várias tentativas foram efetuadas com esta FEQ chamada Whelk-O 1[®] com configuração S, S, com intuito de separar os enantiômeros do ibuprofeno e do flurbiprofeno, que pertencem à mesma classe do naproxeno.

Todos os picos dos solventes e os dos dois enantiômeros do ibuprofeno foram eluídos juntos, quando foi empregada a fase móvel constituída por hexano:isopropanol:ácido acético (80:20:0,5 v/v/v) (Cromatograma IB35). Os fabricantes da coluna Whelk-O 1[®] recomendam uma fase móvel constituída por hexano:isopropanol:ácido acético (98:2:0,5 v/v/v) para proceder-se a separação enantiomérica do ibuprofeno ⁽³⁸⁾.

Aparentemente não foi possível a separação dos enantiômeros do ibuprofeno quando se empregou uma fase móvel constituída de hexano:isopropanol:ácido acético (98:2:0,5 v/v/v) com vazão de 0,9mL/min e detecção em 254nm (Cromatograma IB36). Para identificar todos os picos obtidos com esse sistema eluente foram injetados, em separado, cada solvente constituinte do sistema. Os picos de etanol, isopropanol e hexano podem ser vistos em Cromatograma IB37, IB38 e IB39, respectivamente.

Os modificadores orgânicos absorvem raio UV em relativamente altas proporções quando comparadas com as dos fármacos de interesse, fato este que se confirma no Cromatograma IB23 desenvolvido no λ_{max} de 225nm.

A separação enantiomérica do ibuprofeno foi obtida empregando-se o mesmo sistema, mas com detecção em 225nm (Cromatograma IB40). Pelo estudo comparativo entre os Cromatogramas IB40 e IB41, que foram desenvolvidos utilizando 0,1 e 0,05% de ácido acético, respectivamente, pode-se observar que o ácido orgânico influencia diretamente no tempo de retenção e no formato do pico.

Constatou-se que a presença de ácido acético compondo a fase móvel era necessária para separação e eluição do analito. O Cromatograma IB44 mostra ausência dos picos mesmo após 30 minutos. Já com a fase móvel constituída por hexano:etanol:ácido acético 99:1:0,2 v/v/v, os picos de R- e S-ibuprofeno foram separados com tempos de retenção de 12,44 e 14,22min. (Cromatograma IB46).

Pelo estudo comparativo entre os Cromatogramas IB44 e IB46 concluiu-se que pequenas quantidades de ácido acético na fase móvel são necessárias para que se verifique a eluição dos picos. A FEQ utilizada nestes ensaios, a Whelk-O 1[®], tem propriedades π -aceptoras e π -doadoras. Em meio ácido, o ibuprofeno permanece na forma não dissociada, visto que seu pKa é 5,39. Por esta razão, são observadas ligações por pontes de hidrogênio com a FEQ, na forma estereoespecífica. Por outro lado, em pH maior do que 5,39, isto é, na ausência de ácido acético na fase móvel, o ibuprofeno se encontra na forma ionizada (CÔO⁻), unindo-se à FEQ Whelk-O 1[®], por meio de fortes ligações iônicas.

A ordem de eluição foi determinada pela injeção de S-ibuprofeno (Cromatogramas IB46 e IB47). Devido à configuração (S, S) da coluna, era de se esperar que o S-ibuprofeno tivesse a eluição retardada pela coluna, uma vez que suas ligações com a FEQ são de maior afinidade. Os resultados obtidos confirmaram o pressuposto ^(38, 110).

Comparando-se os modificadores orgânicos etanol e isopropanol, verificou-se que o etanol confere aos picos melhor resolução e perfil mais agudo dos picos em relação aos dos obtidos com o isopropanol.

A vazão da fase móvel de 0,8 mL/min. foi o que deu origem a maior resolução e seletividade entre os isômeros apesar do tempo de análise ter sido relativamente longo, 17-18 min. (Cromatograma IB49). Por outro lado, a vazão de 1,0 mL/min resultou na instabilidade da linha de base (Cromatograma IB51), com modesta redução no tempo de análise. Os Cromatogramas IB52 a IB57 apresentaram os efeitos de polaridade da fase móvel pelo aumento da concentração do etanol. Um aumento na concentração de etanol, diminuiu o tempo de análise mas, ao mesmo tempo comprometeu a resolução e a seletividade dos picos.

A fase móvel constituída por hexano:etanol:ácido acético (95:5:0,5 v/v/v) apresentou separação parcial dos enantiômeros. Estudou-se o efeito da vazão na separação dos enantiômeros do ibuprofeno. Foram realizadas duas análises empregando-se as vazões de 0,9 e 0,5 mL/min, conforme ilustram os Cromatogramas IB56 e IB57. Pode-se observar que a polaridade e a vazão da fase móvel influencia a separação dos isômeros numa forma mais aguda. Por esta razão foi empregado isopropanol como modificador orgânico. Um sistema com fase móvel constituída por hexano:isopropanol: ácido acético 96:4:0,2 v/v/v, com vazão de 0,9 mL/min e detecção em 225 foi considerado apropriado para a validação do método e aplicação na análise enantiomérica do ibuprofeno, nas formulações farmacêuticas selecionadas. O cromatograma IB59 ilustra uma análise obtida com o sistema selecionado, onde observa-se a separação completa dos enantiômeros do ibuprofeno.

7.3.6 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FLURBIPROFENO

A separação enantiomérica do flurbiprofeno foi efetuada utilizando-se colunas dos tipos Chiralcel OD[®] e Chiradex[®]. Empregou-se a coluna Chiralcel OD[®] para separações isoméricas empregando-se hexano como eluente principal, modificado com isopropanol e etanol. Quantidades muito pequenas de ácido acético também foram adicionadas às fases móveis testadas.

O flurbiprofeno apresentou separação parcial com o sistema hexano:isopropanol:ácido acético (97:03:0,3) como fase móvel. No entanto, os picos não alcançaram a linha de base (Cromatogramas F1, F2, F3).

A vazão da fase móvel utilizada foi 0,5 mL/min. para melhorar o tempo de interação entre o soluto e as moléculas quirais da FEQ. Não foi conseguida nenhuma melhora na separação, muito pelo contrário, o tempo de retenção aumentou drasticamente, em comparação com o que se obteve quando a vazão foi de 1,0 mL/min (Cromatograma F3).

Um aumento na polaridade da fase móvel resultou em diminuição da seletividade dos picos (Cromatogramas F4, F5, F6). Este fato ocorreu provavelmente porque os modificadores orgânicos, como o isopropanol, competem com as moléculas dos solutos na coluna para formar pontes de hidrogênio com as moléculas quirais da FEQ. Esta competição, entre o modificador orgânico e as moléculas de soluto, conduziu ao deslocamento das moléculas do flurbiprofeno pela coluna, antes que ele pudesse interagir com as moléculas quirais da FEQ levando à complexação temporária.

Com 10 % de isopropanol na fase móvel, nenhuma separação foi observada (Cromatograma F6). Os Cromatogramas F7, F8, F9 e F10 apresentam resultados interessantes decorrentes dos estudos dos efeitos da polaridade da fase móvel sobre o fator de capacidade dos picos retidos

Comparando-se os Cromatogramas F7 e F10, constatou-se a necessidade e a importância da otimização das condições instrumentais. A escolha do comprimento de onda de detecção, atenuação, velocidade do papel e sensibilidade de detecção são tão importantes quanto o sistema eluente ou a escolha da coluna quiral.

A substituição do ácido acético pelo ácido trifluoroacético, que é um ionizador forte, resultou no aparecimento dos problemas na linha de base. Os picos perderam a forma e a simetria (Cromatograma F11 e F12).

O metanol, em concentrações baixas, foi utilizado para evitar danos às colunas do tipo celulose, pois é uma FEQ que deve ser utilizada em fase normal. Solventes mais polares, como o metanol, em alta concentração podem danificá-las. Não foram observadas melhoras nas separações isoméricas. Com polaridade intermediária, o etanol foi o escolhido para substituir o isopropanol (1,0 %) com vazões de 1,0 e 0,7 mL/min. (Cromatogramas F14 e F15). Os picos não se separaram completamente, além disso, houve aumento do tempo de retenção.

O efeito do grau de ionização das moléculas do soluto foi estudado pelo aumento sistemático da quantidade de ácido acético na fase móvel. O aumento gradativo da concentração de ácido acético, de 0,2 a 1,0 % (v/v) (Cromatogramas F15, F16, F17, F18) não proporcionou melhora na seletividade. No entanto, o fator de capacidade dos picos aumentou proporcionalmente à concentração do ácido acético presente na fase móvel. Estes resultados podem ser corroborados pelos resultados obtidos, anteriormente, por FARKAS e colaboradores ⁽⁶⁸⁾ e BEESON e colaboradores ⁽¹⁶⁾, em que os profenos, na forma não dissociada, apresentam menos afinidade pelas pontes de hidrogênio com as moléculas quirais da fase estacionária.

Um aumento maior na polaridade da fase móvel empregando-se 5 e 10 % de etanol (Cromatogramas F19 e F20) conduziu à perda completa da seletividade dos picos. A dietilamina é considerada um agente redutor de caudas dos picos quando se empregam colunas do tipo Chiralcel OD[®] (Cromatograma F20).

Empregando-se o sistema eluente constituído por 95 % de acetonitrila, 5 % de metanol, 0,3 % de ácido acético e 0,2 % de trietilamina e coluna Chiradex[®] não foi possível a separação dos isômeros do flurbiprofeno (Cromatograma F21). A injeção individual do isômero S-flurbiprofeno pode ser vista no Cromatograma F23.

Os ensaios preliminares descritos para a separação enantiomérica do ibuprofeno foram repetidos para a separação enantiomérica do flurbiprofeno. As tentativas de separação empregando-se os sistemas de fases móveis utilizados para a separação enantiomérica do ibuprofeno não foram eficientes para a separação enantiomérica do flurbiprofeno. Os resultados podem ser vistos nos Cromatogramas F24 a F35.

O tempo de retenção e os valores de k_1 e k_2 são inversamente proporcionais à concentração e à polaridade do modificador orgânico, tais como, os álcoois, por exemplo. Entre os álcoois C_1 a C_4 , os primários são eluentes mais fortes em relação aos álcoois secundários e terciários. Entretanto, é difícil prever o efeito de álcoois sobre a enantiosseletividade dos enantiômeros para obtenção de resolução adequada e máxima seletividade ⁽¹⁵⁹⁾.

Os ensaios realizados para a separação dos isômeros do flurbiprofeno foram efetuados empregando-se a coluna do tipo Whelk-O 1[®] e a fase móvel constituída por várias proporções e combinações de hexano, isopropanol e etanol, contendo traços de ácido acético.

Inicialmente empregou-se a fase móvel constituída de hexano:isopropanol:ácido acético (80:20:0,5 v/v/v) (Cromatograma F36). Houve reconhecimento quiral dos isômeros do flurbiprofeno. Entretanto, não foi possível a separação completa dos picos até a linha de base, um pré-requisito essencial para quantificação dos enantiômeros com segurança.

O $\lambda_{\max}$ de absorção do flurbiprofeno encontra-se por volta de 246nm, já o ibuprofeno apresenta absorção muito baixa neste mesmo comprimento de onda no UV. Por esta razão, não foi possível o desenvolvimento do método de CLAE-FEQ para o ibuprofeno empregando $\lambda_{\max}$ de 254nm ou de 263nm. Observou-se, pelo tamanho dos picos e pela concentração injetada do ibuprofeno e do flurbiprofeno, que este último,

apresentou maior intensidade de absorção no UV devido à presença do grupo cromóforo fluor. Esse fator deve ser levado em consideração quando do desenvolvimento do método cromatográfico, especialmente no caso de compostos quirais onde visa-se a detecção e quantificação dos enantiômeros presentes nas amostras, às vezes em pequenas quantidades.

Os Cromatogramas F37 e F38 ilustram a separação completa dos enantiômeros do flurbiprofeno com fase móvel constituída por hexano:isopropanol:ácido acético (96:4:0,1 v/v/v) empregando vazões de 0,9 e 0,8, respectivamente. A vazão de 0,8 mL/min prolonga o tempo de análise em pouco mais de um minuto com pequena melhora na seletividade.

Com a diminuição da polaridade da fase móvel empregando-se 20, 4, 2 e 1,0% v/v de isopropanol, houve melhora na seletividade e resolução dos picos. Por outro lado, verificou-se um aumento no fator capacidade de ambos os picos, como pode ser visto nos Cromatogramas F36, F37, F39, F40, respectivamente.

Assim como na separação dos enantiômeros do ibuprofeno, foi empregado etanol como modificador orgânico, visando a separação enantiomérica do flurbiprofeno. O Cromatograma F41 apresenta somente os picos dos solventes usados na preparação da amostra. Os picos do analito não foram eluídos. Assim, ficou comprovado que a presença de ácido acético é indispensável para a eluição dos picos. Ao mesmo tempo, pode-se concluir que em pH maior do que o pKa do flurbiprofeno (pKa 4,2) ⁽¹⁵⁸⁾ e na ausência de ácido acético, o fármaco se encontra na forma dissociada e realizando pontes de hidrogênio e ligações iônicas fortes com a FEQ Whelk-O 1[®] (110, 169, 170, 219).

Empregando-se na fase móvel concentração menor de ácido acético, isto é, 0,05% v/v, verificou-se que tal quantidade de ácido não foi suficiente para a conversão completa do analito na forma não dissociada. PEHOURCQ e colaboradores ⁽¹⁵⁸⁾ relataram a presença de 86% do flurbiprofeno na forma ionizada em uma solução com pH 5,0. Os Cromatogramas F43 e F44 mostram picos menores de R e de S-flurbiprofeno, obtidos com a mesma concentração do analito, embora, tenha havido reconhecimento e separação dos enantiômeros com resolução maior. Esse fato pode ser atribuído às ligações prejudicadas do analito com a FEQ.

O Cromatograma F45S confirma a ordem de eluição dos enantiômeros. A eluição posterior do S-antípoda está de acordo com a configuração da FEQ Whelk-O 1[®] (38, 110).

Pelo estudo comparativo entre os Cromatogramas F37 e F47 obtidos empregando-se os sistemas com fases móveis constituídas por hexano:isopropanol:ácido acético 96:4:0,1 v/v/v e hexano:etanol:ácido acético 96:4:0,5 v/v/v (com outras condições fixas) conclui-se que o etanol favorece o aparecimento de picos mais agudos para os enantiômeros do flurbiprofeno, além da diminuição da cauda de ambos os picos.

Com o sistema de fase móvel constituído por hexano:etanol:ácido acético (96:4:0,5 v/v/v) e vazão de 0,9 e 0,8 mL/min foi possível separar os isômeros do flurbiprofeno. A vazão de 0,9 mL/min proporcionou melhora no tempo de análise (9,54 min.) com pouco comprometimento da seletividade.

Resultados interessantes podem ser vistos nos Cromatogramas F49 e F50. Nota-se que houve comprometimento da seletividade, com aumento da concentração de etanol (5%) na fase móvel (Cromatograma F49) constituída por hexano:etanol:ácido acético 95:5:0,5 v/v/v. O efeito da concentração de ácido acético pode ser visto no Cromatograma F50 (com condições iguais às do Cromatograma F49).

O fabricante da FEQ Whelk-O 1[®] recomenda a utilização de 0,5% (v/v) de ácido acético para obter-se a separação enantiomérica de fármacos derivados do ácido 2-arilpropiónico (38). Com vazão menor, isto é, 0,8 mL/min prolongou-se o tempo de análise, porém obteve-se uma leve melhora na seletividade (Cromatograma F51).

O Cromatograma F52 mostra o perfil obtido empregando-se FEQ Whelk-O 1[®] e fase móvel constituída por hexano:etanol:ácido acético (95:5:0,2 v/v/v), vazão de 0,9 mL/min. e detecção em 246nm. foi o selecionado para validação do método e a aplicação na análise enantiomérica do flurbiprofeno em amostra comercial.

7.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (CLAE-FEQ)

A validação de um método analítico garante, por meios científicos, que um fármaco seja analisado de maneira uniforme e reprodutível. Sem a confiança nas medidas feitas para a determinação da substância, será difícil confirmar se o método é exato, preciso, específico e reprodutível. Um processo de validação bem conduzido, além de atender às exigências legais e éticas relacionadas ao tipo de produto, resultará na confiabilidade do processo de análise.

A validação dos métodos propostos para a determinação quantitativa dos enantiômeros do atenolol e dos enantiômeros do metoprolol nas amostras comerciais, foi realizada segundo as recomendações de Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾, da AOAC INTERNATIONAL ⁽¹¹⁾ e do ICH ^(100, 101). Segundo estes compêndios oficiais, a validação de um método analítico para análise de fármacos em medicamentos pode ser abordada pela especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão. Cada um desses itens foi estudado na validação dos métodos para a análise dos enantiômeros do atenolol e do metoprolol.

7.4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO ATENOLOL

Após os testes preliminares, foi constatado que a coluna Chiralcel OD[®] foi a que apresentou melhores resultados na separação dos isômeros do atenolol e do metoprolol. Assim sendo, a validação dos métodos propostos foi efetuada empregando-se essa coluna. Dentre os vários sistemas de fases móveis estudados utilizando-se a coluna Chiralcel OD[®], o sistema constituído pelos parâmetros enumerados a seguir foi o escolhido para validação do método:

Coluna : Chiralcel OD[®]

Fase móvel : hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v)

Vazão da fase móvel : 1,0 mL/min.

Deteção : UV 276nm

Temperatura : ambiente (24°C ± 2)

As colunas com fase estacionária de celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) e outras derivadas de celulose não resistem a pressões elevadas. A pressão máxima recomendada pelo fabricante da coluna é de 700 psi ⁽⁴⁶⁾. Durante os testes preliminares verificou-se que na vazão de 1,0 mL/min, empregando o sistema de fase móvel escolhido, a pressão exercida na coluna estava abaixo do limite permitido. As colunas contendo fases estacionárias derivadas de celulose podem ser empregadas em intervalos de temperaturas entre 0°C a 40°C. Nesse trabalho as separações foram realizadas à temperatura ambiente (24°C ± 2).

As soluções das amostras e dos padrões do atenolol e do metoprolol para a análise quantitativa foram preparadas no mesmo dia das análises, com exceção daquelas empregadas nos ensaios preliminares. Durante os testes preliminares as soluções de álcoois aminicos foram armazenadas por um período de não mais de que um mês à temperatura de -18°C . Não foram observados quaisquer sinais de degradação durante esse período e os resultados estão em acordo com a literatura ^(36, 119). LAMPRECHT e colaboradores ⁽¹¹⁹⁾ apresentaram dados sobre estabilidade do atenolol a 6°C e a 25°C . As soluções não apresentaram degradação significativa a 6°C durante 14 dias. Por outro lado, amostras do atenolol armazenadas à temperatura ambiente (25°C) e expostas à luz do dia apresentaram 15% de perda após 5 dias com aparecimento de um pico adicional no cromatograma após esse período.

Para verificar-se a especificidade dos métodos propostos foram determinados os cromatogramas dos placebos das amostras estudadas. Os placebos das amostras foram injetados, após terem passado pelo mesmo tratamento das amostras comerciais e não apresentaram interferência nos métodos para a determinação dos enantiômeros do atenolol. As amostras de placebo foram preparadas no laboratório a fim de assegurar os resultados obtidos.

A Tabela 32 apresenta os valores dos desvios padrão e dos coeficientes de variação para o R-atenolol e para o S-atenolol. Estes resultados foram obtidos para cada amostra, empregando-se para os cálculos a média de dez determinações. Para se determinar a precisão são recomendadas réplicas de 6 a 10 determinações analíticas ^(105, 106). Para que um método seja considerado preciso, os valores dos coeficientes de variação devem ser $< 2,0\%$ ^(36, 184). Os valores dos coeficientes de variação obtidos foram abaixo do valor recomendado.

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão dos valores obtidos. Os testes foram efetuados segundo as recomendações da Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾, da AOAC INTERNATIONAL ⁽¹¹⁾ e do ICH ^(100, 101). Nas Tabelas 34 e 35 estão apresentados os resultados obtidos na análise das amostras. Com base nos valores do desvio padrão, pode-se concluir que o método proposto é exato para a análise do R- e do S-atenolol nas amostras comerciais contendo este β -bloqueador.

7.4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO METOPROLOL

Os isômeros do metoprolol foram separados empregando-se coluna Chiralcel OD[®]. Após os estudos preliminares verificou-se que o sistema com os parâmetros enumerados a seguir foi o que apresentou a melhor separação, tendo sido escolhido para a validação do método:

Coluna : Chiralcel OD[®]

Fase móvel : hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v)

Vazão da fase móvel : 0,8 mL/min

Deteção : UV 276nm

Temperatura : ambiente (24°C ± 2)

A vazão de 0,8 mL/min. foi a escolhida, pois a pressão exercida na coluna estava abaixo do limite máximo permitido.

As separações foram realizadas à temperatura ambiente (24°C ± 2). Verificou-se que variações na temperatura, na faixa descrita, não conduziam a alterações na separação dos isômeros.

Para verificar-se a especificidade do método proposto foram analisados os placebos das amostras estudadas nas mesmas condições de tratamento da amostra comercial. O comprimento de onda escolhido para a detecção no ultravioleta foi de 276nm, pois nesse comprimento de onda não houve interferência dos excipientes da formulação farmacêutica. Não houve também interferência dos solventes orgânicos da fase móvel na análise dos enantiômeros do metoprolol na amostra comercial (Figura 32).

Na Tabela 37 estão apresentados os valores dos desvios padrão e dos coeficientes de variação para o (R)-metoprolol e para o (S)-metoprolol. Estes resultados foram obtidos para cada amostra empregando-se para os cálculos, a média de dez determinações. Os valores dos coeficientes de variação obtidos foram abaixo de 2,0%.

O teste de recuperação está relacionado com a exatidão dos valores obtidos. Os testes foram efetuados segundo as recomendações da Farmacopéia Americana 24 ed. ⁽²⁰⁴⁾, da AOAC INTERNATIONAL ⁽¹¹⁾ e do ICH ^(100, 101). Nas Tabelas 39 e 40 estão apresentados os resultados obtidos na análise das amostras. Com base nos valores do recuperação, pode-se concluir que o método proposto apresenta exatidão para a análise de (R)- e (S)-metoprolol nas amostras comerciais selecionadas para o estudo.

7.4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ISÔMEROS DO FLURBIPROFENO

Após os testes preliminares, foi constatado que a coluna Whelk-O 1[®] foi a que apresentou melhores resultados na separação dos isômeros do flurbiprofeno. Assim sendo, a validação dos métodos propostos foi efetuada empregando-se essa coluna. O sistema constituído pelos parâmetros enumerados a seguir foi o escolhido para validação do método:

Coluna : Whelk-O 1[®]

Fase móvel : Hexano:etanol:ácido acético (95:5:0,2 v/v/v)

Vazão da fase móvel : 0,9 mL/min.

Deteção : UV 246nm

Temperatura : ambiente (24°C ± 1)

Temperatura da coluna controlada em: 24°C (forno)

A separação enantiomérica do flurbiprofeno foi obtida empregando-se fase estacionária quiral do tipo Whelk-O 1[®], pelo método proposto (Figura 33). Os parâmetros de separação, como fator de capacidade (k_1 e k_2), seletividade dos picos (α) e resolução dos picos (R_s) podem ser encontrados na Tabela 41. Os dados comprovam a separação completa e eficiente dos enantiômeros do flurbiprofeno. A ordem de eluição foi determinada pela injeção do S-antípoda na forma isolada. Verificou-se que o isômero R foi eluído primeiro confirmando os resultados esperados, visto que a configuração estereoisomérica da coluna é 3S, 4S. Por esta razão, o isômero S seria o mais retido no interior da coluna.

A Figura 34 apresenta a curva de calibração do S-flurbiprofeno contendo nove pontos. A curva apresenta boa linearidade na faixa de concentração estudada, com coeficiente de correlação $R=0,9993$ ($y = 96499x - 54820$). Em altas concentrações a curva perde a linearidade. Não foi possível a construção da curva de correlação do R-flurbiprofeno devido a não disponibilidade do padrão correspondente.

A validação de um método deve ser realizada para comprovar a adequação do método desenvolvido para determinada finalidade. Alguns parâmetros como precisão e exatidão são utilizados para assegurar a validade do método proposto. Um método é considerado preciso se apresentar coeficiente de variação menor do que 2,0% ^(105, 106, 184). A precisão do método foi determinada pela reprodução da resposta em dois níveis de concentrações, ponto baixo (8,0µg/mL) e ponto alto (20,0µg/mL) da curva. A Tabela 42 apresenta os dados de reprodução da resposta, que comprovam a precisão do método proposto.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram determinados baseados no desvio padrão das respostas (dez injeções) e na inclinação da curva padrão do S-flurbiprofeno. A Tabela 42 apresenta o limite de detecção (4,7 pg) e o limite de quantificação (20,0 pg) para o S-flurbiprofeno na forma farmacêutica, nas condições do estudo. Os dados apresentados comprovam que o método proposto é extremamente sensível para detecção e quantificação do isômero S do flurbiprofeno com precisão e exatidão.

A exatidão do método foi determinada pela recuperação da quantidade conhecida de padrão adicionado à matriz da preparação farmacêutica. O ensaio foi efetuado em três níveis de concentrações, e a média determinada. A recuperação média do R-FLU foi de 100,1%, enquanto que a recuperação média do S-FLU foi de 100,4%. Os dados estatísticos da recuperação do padrão, apresentados nas Tabela 44 e 45, comprovam a exatidão do método.

7.4.4 RELAÇÃO ENTRE OS ISÔMEROS DO ATENOLOL, DO METOPROLOL E DO FLURBIPROFENO

A Farmacopéia Americana 24ed⁽²⁰⁴⁾ descreve a determinação da relação entre os diastereoisômeros do labetalol, na matéria-prima. Entretanto, não foi encontrada nenhuma referência descrevendo a determinação da relação entre os enantiômeros estudados.

Os cálculos das porcentagens de cada isômero nas amostras estudadas foram efetuados aplicando-se as seguintes fórmulas:

$$Ar \times 100 / (Ar+As) = \% \text{ de (R)-isômero}$$

$$As \times 100 / (Ar+As) = \% \text{ de (S)-isômero}$$

Onde, Ar e As correspondem à área do (R)-enantiômero e do (S)-enantiômero, respectivamente.

As Tabelas 33 e 38 mostram as porcentagens dos isômeros do (R)- e do (S)-atenolol e do (R)- e do (S)-metoprolol, respectivamente, determinadas pelos métodos propostos para cada um dos compostos. Os órgãos oficiais ainda não estabeleceram os limites para controlar a proporção dos enantiômeros em medicamentos contendo atenolol e metoprolol. Entretanto, os valores quase iguais confirmam o estado racêmico do atenolol e do metoprolol nas preparações farmacêuticas selecionadas.

A proporção enantiomérica do flurbiprofeno foi determinada pela injeção da amostra repetida vezes, em dois níveis de concentração, 8,0µg/mL e 20,0µg/mL. Calculou-se a proporção enantiomérica dividindo-se a concentração do isômero pela concentração total dos isômeros determinados pelo método proposto⁽²⁰⁴⁾. Os valores expressos em porcentagens estão apresentados na Tabela 43, comprovando a presença dos isômeros em proporções iguais, isto é, como mistura racêmica.

8. CONCLUSÕES

Nas condições em que o estudo foi realizado pode-se concluir que.

- O sistema constituído por coluna do tipo Chiralcel OD[®] e fase móvel contendo hexano:isopropanol:dietilamina (70:30:0,1 v/v), vazão de 1,0 mL/min e detecção a 276nm foi capaz de separar os enantiômeros do betaxolol. Este sistema deu origem à separação de (R,S)-betaxolol com os seguintes parâmetros: fator de capacidade $k_1=0,70$, $k_2=1,45$ e seletividade de 2,07. Não foi possível determinação de ordem de eluição e validação do método proposto devido carência de padrões de enantiômeros puros.
- Um sistema inédito de CLAE-FEQ foi desenvolvido para separar os quatro enantiômeros do nadolol em única injeção. O sistema foi constituído por coluna do tipo Chiralcel OD[®] com fase móvel contendo hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (87:13:0,2:0,2 v/v), vazão de 0,8 mL/min e detecção a 276nm. Neste sistema foram separados os enantioméricos: (RSR, RRS, SRS, SSR)-nadolol com os seguintes parâmetros: fator de capacidade $k_1=3,40$, $k_2=4,16$, $k_3=7,73$, $k_4=8,76$ e seletividade de 1,22 (entre os picos 1 e 2), 1,12 (entre os picos 3 e 4) e 1,88 (entre os picos 2 e 3). Não foi possível a determinação da ordem de eluição como também a validação do método proposto devido carência de padrões dos enantiômeros puros.
- A determinação quantitativa dos enantiômeros do atenolol pode ser efetuada através do método proposto empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral Chiralcel OD[®], hexano:etanol:dietilamina:ácido acético (60:40:0,2:0,2 v/v/v/v) como fase móvel, vazão de 1,0 mL/min, detecção em 276nm e à temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$).

- A determinação quantitativa dos enantiômeros do metoprolol pode ser efetuada através do método proposto empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral Chiralcel OD[®], hexano:etanol:diethylamina:ácido acético (40:60:0,2:0,2 v/v/v/v) como fase móvel, vazão de 0,8 mL/min, detecção em 276nm e à temperatura ambiente (24°C ± 2).
- A determinação quantitativa do S-enantiômero do flurbiprofeno pode ser efetuada através do método proposto empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral Whelk-O 1[®], hexano:etanol:ácido acético (95:5:0,2 v/v/v) como fase móvel, vazão de 0,9 mL/min, detecção em 246nm e à temperatura controlada em 24°C.
- Os métodos propostos para a determinação enantiomérica do atenolol, do metoprolol e do flurbiprofeno não sofreram interferência dos excipientes das formulações farmacêuticas analisadas, sendo portanto, enantiosseletivos para os fármacos quirais estudados.
- Os métodos propostos para a determinação dos enantiômeros do atenolol, do metoprolol e do flurbiprofeno são precisos, exatos, específicos e rápidos. Os valores dos coeficientes de variação comprovam a precisão dos métodos propostos. Os testes de recuperação efetuados apresentaram resultados que comprovam a exatidão dos métodos propostos.
- Os coeficientes de correlação do método proposto para a determinação enantiomérica do (R)-atenolol ($r = 0,9991$) e do (S)-atenolol ($r = 0,9980$), mostraram que existe linearidade na faixa de concentração de 50,0-130,0 µg/mL. Os coeficientes de correlação do método proposto para a determinação enantiomérica do (R)-metoprolol ($r = 0,9990$) e do (S)-metoprolol ($r = 0,9988$), mostraram que existe linearidade na faixa de concentração de 30,0-110,0 µg/mL. O coeficiente de correlação do método proposto para a determinação enantiomérica do (S)-flurbiprofeno ($r = 0,9993$), mostraram que existe linearidade na faixa de concentração de 2,0-18,0 µg/mL.

- Os valores de limite de detecção e o limite de quantificação de atenolol, metoprolol e flurbiprofeno comprovam a sensibilidade elevada dos métodos. Os limites de detecção e os limites de quantificação para o atenolol, para o metoprolol e para o flurbiprofeno permitem a aplicação futura dos métodos no controle de qualidade enantiomérica dos medicamentos.
- As relações entre os enantiômeros do atenolol, do metoprolol e do flurbiprofeno, determinadas separadamente, comprovam a presença destes compostos nos medicamentos sob a forma racêmica.
- A separação enantiomérica do pindolol pode ser efetuada de forma rápida e eficiente através da cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral, α -Burke 2[®] e acetonitrila:etanol (acetato de amônio 21,62 mM) (50:50 v/v) como fase móvel, vazão de 0,8 mL/min, detecção em 220nm e à temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$). A separação enantiomérica do pindolol foi possível empregando-se FEQ Chiralcel OD[®], entretanto, o tempo de análise prolongado impossibilita o emprego na análise rotineira dos enantiômeros do pindolol.
- As colunas do tipo β -ciclodextrina e α -Burke 2[®] empregadas neste trabalho não foram capazes de separar os enantiômeros do ibuprofeno e do flurbiprofeno, embora já tenha sido publicada a separação enantiomérica de antiinflamatórios não-esteróides empregando-se a coluna Cyclobond I[®].
- Os dados publicados anteriormente foram comprovados neste trabalho, demonstrando diferenças substanciais entre duas colunas de β -ciclodextrina, a Cyclobond I[®] e a Chiradex[®], com relação a enantiosseletividade.
- A separação enantiomérica do ibuprofeno pode ser efetuada de forma rápida e eficiente através da cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral, Whelk-O 1[®], fase móvel constituída por hexano:etanol:ácido acético (95:05:0,1 v/v/v), vazão de 0,9 mL/min., detecção UV em 225nm e a temperatura controlada com forno em $24^{\circ}\text{C} \pm 1$.

- A vantagem principal dos métodos propostos é que em uma única corrida cromatográfica poder-se-á promover a separação quantitativa dos (R)- e (S)-enantiômeros simultaneamente, de maneira adequada e rápida. Com o aumento do interesse de se empregar, em formulações farmacêuticas, fármacos enantiomericamente puros, os métodos padronizados, tanto para indústrias farmacêuticas como para as autoridades, poderão ser utilizados para a determinação simultaneamente das impurezas quirais, tornando-se apropriado para o controle de qualidade de preparações farmacêuticas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of cellulose based chiral stationary phases in the resolution of some beta-adrenoceptor antagonists. *Anal. Lett.*, New York, v.26, p.271-279, 1993.
2. ABOUL-ENEIN, H.Y., ABOU-BASHA, L.I. HPLC separation of nadolol and enantiomers on chiralcel OD column. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.19, p.383-392, 1996.
3. ADAMS, S.S., CLIFFE, E.E., LESSEL, B., NICHOLSO, J.S. Some biological properties of 2-(4-isobutylphenyl)-propionic acid. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.56, p.1686, 1967.
4. AHUJA, S. *Chiral separation by liquid chromatography*. Washington: American Chemical Society, 1991. 239p.
5. ALLENMARK, S. Optical resolution of liquid chromatography on immobilized bovine serum albumin. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.9, p.425-442, 1986.
6. ALLENMARK, S. Chromatographic methods for optical purity determination of drugs. *Acta Pharm. Nord.*, Stockholm, v.2, p.161-170, 1990.
7. ALLENMARK, S., ANDERSSON, S. Optical resolution of some biologically-active compounds by chiral liquid-chromatography on BSA-silica (resolvosil®) columns. *Chirality*, New York, v.1, p.154-160, 1989.
8. ALLENMARK, S., BOMGREN, H., BORÉN, H. Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases. 4. Molecular interaction forces and retention behavior in chromatography on bovine serum albumin as a stationary phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.316, p.617-624, 1984.
9. ARAI, T. Chiral separation of pharmaceuticals possessing a carboxy moiety. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.717, p.295-311, 1998.
10. ARMSTRONG, D.W., NAIR, U.B. Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. *Electrophoresis*, Weinheim, v.18, p.2331-2342, 1997.
11. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15.ed. Arlington, 1990. p.15-17.
12. BACZUK, R.J., LANDRAM, G.K., DUBOIS, R.J., DEHM, H.C. Liquid chromatographic resolution of racemic β - 3, 4 – dihydroxyphenylalanine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.60, p.351-361, 1971.

13. BALMER, K., LAGERSTOM, P., PERSSON, B. Reversed retention order and other stereoselective effects in the separation of amino alcohol's on Chiralcel OD. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.592, p.331-337, 1992.
14. BALMER, K., PERSSON, A., LAGERSTROM, P., PERSSON, B., SCHILL, G. Liquid-chromatographic separation of the enantiomers of metoprolol and its alpha-hydroxy metabolite in Chiralcel OD for determination in plasma and urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.553, p.391-397, 1991.
15. BANGAH, M., JACKMAN, G., BOBIK, A. Determination of pindolol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.183, p.255-259, 1980.
16. BEESON, M.D., VIGH, G. Examination of the retention behaviour of underivatised profen enantiomers on cyclodextrin silica stationary phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.634, p.197-204, 1993.
17. BELAS, F.J., PHILLIPS, M.A., SRINIVAS, N.R., BARBHAIYA, R.H., BLAIR, I.A. Simultaneous determination of nadolol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.9, n.3, p.140-145, 1995.
18. BERTHAULT, F., KINTZ, P., MANGIN, P. Chiral separation of seven beta-blockers. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v.55, p.12-19, 1997.
19. BHUSHAN, R., THIONGO, G.T. Direct enantioseparation of some β -adrenergic blocking agents using impregnated thin-layer chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.708, p.330-334, 1998.
20. BHUSHAN, R., MARTENS, J. Resolution of enantiomers of ibuprofen by liquid chromatography: a review. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.12, p.309-316, 1998.
21. BOBBITT, D.R., LINDER, S.W. Recent advances in chiral detection for high performance liquid chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, Amsterdam, v.20, p.111-123, 2001.
22. BOOTH, T.D., WAHNON, D., WAINER, I.W. Is chiral recognition a three pointprocess? *Chirality*, New York, v.9, p.96-98, 1997.
23. BOPP, R.J. Development and validation of liquid chromatographic assays for the regulatory control of Pharmaceutical. In: RILEY, C.M., LOUGH, W.J., WAINER, J.W., eds. *Pharmaceutical and biomedical application of liquid chromatography*. New York: Pergamon Press, Elsevier, 1994. 315-344.
24. BRITISH Pharmacopoeia 1999. London: Her Majesty's Stationary Office, 1999. p. A144, 135-136, 196, 671-673, 778-780, 976-978, 1145-1146.

25. BRITTAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharm. Technol., Ed. Bras.*, v.2, p.4-9, 1998
26. BRUNE, K., BECK, W.S., GEISSLINGER, G., MENZEL-SOGLOWEK, S., PESKER, B.M., PESKER, B.A. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia*, Basel, v.47, p.257-261, 1991.
27. BRUNE, K., GEISSLINGER, G., MENZEL-SOGLOWEK, S. Pure enantiomers of 2-arylpropionic acid: tools in pain research and improved drugs in rheumatology. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.32, p.944-952, 1992.
28. CALDWELL, J. Stereochemical determinations of the nature and consequences of drug metabolism. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.694, p.39-49, 1995.
29. CALDWELL, J. Importance of stereospecific bioanalytical monitoring in drug development. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.719, p.3-13, 1996.
30. CAMILLERI, P., DYKE, C. Effect of deuterium oxide on the resolution of the optical isomers of ibuprofen on an α -acid glycoprotein column. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.518, p.277-281, 1990.
31. CARABAZA, A., SUESA, N., TOST, D., PASCUAL, J., GOMEZ, M., GUTIERREZ, M., ORTEGA, E., MONTSERRAT, A.M.G., MIS, R., CABRE, F., MAULEON, D., CARGANICO, G. Stereoselective metabolic pathway of ketoprofen in the rat: incorporation into triacylglycerol and enantiomeric inversion. *Chirality*, New York, v.8, p.163-172, 1996.
32. CASTELLANI, L., FLIEGER, M., SINIBALDI, M. Enantiomer separation of 2-arylpropionic acids on an ergot alkaloid based stationary phase microbore column application. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.17, p.3695-3703, 1994.
33. CECCATO, A., HUBERT, P., CROMMEN, J. Direct liquid-chromatographic enantioseparation of sotalol and other beta-blockers using an α 1-acid glycoprotein-based chiral stationary phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.760, p.193-203, 1997.
34. CHANKVETADZE, B., YASHIMA, E., OKAMOTO, Y. Tris(chloro-disubstituted and methyl-disubstituted phenylcarbamate)s of cellulose as chiral stationary phases for chromatographic enantioseparation. *Chem. Lett.*, Tokyo, v.4, p.617-620, 1993.
35. CHERIYAN, U. Canadian analytical method validation, requirements and global harmonization. Code of Federal Regulations (21 CFR), Foods and Drugs; Abril 1994. 9p. [Apostila].
36. CHIAP, P., HUBERT, P.H., BOULANGER, B., CROMMEN, J. Validation of an automated method for the liquid chromatographic determination of atenolol in plasma: application of a new validation protocol. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.391, p.227-238, 1999.

37. CHING, M.S., LENNARD, M.S., GREGORY, A., TUCKER, G.T. Measurement of underivatized metoprolol enantiomers in human plasma by high performance liquid chromatography with a chiral stationary phase. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.497, p.313-318, 1989.
38. CHIRAL APPLICATION GUIDE III. Morton Grove: Regis Technologies, s.d. 77p.
39. CHIROBIOTIC™ HANDBOOK. Guide to using macrocyclic glycopeptide bonded phases for chiral liquid chromatographic separations. 2.ed. Whippany: Advanced Separation Technologies, 1997. 32p.
40. CHO, H.S. Determinação enantioméricas de β -bloqueadores em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência com fase quiral. São Paulo, 1998. p.177 (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
41. CHO, H.S., SANTORO, M.I.R.M. Análise de propranolol por cromatografia líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.33, p.23, 1997.
42. MOFFAT, A.C., JACKSON, J.V., MOSS, M.S., WIDDOP, B. In: _____. *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*. 2.ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986. 1223p.
43. COX, S.R., BROWN, M.A., SQUIRES, D.J., MURRILL, E.A., LEDNICER, D., KNUTH, D.W. Comparative human study of ibuprofen enantiomer plasma concentrations produced by two commercially available ibuprofen tablets. *Biopharm. Drug Dispos.*, Bognor Regis, v.9, p.539-549, 1988.
44. CROM, W.R. Effect of chirality, on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.49, p.S9-S14, 1992.
45. CYCLOBOND™. *Chiral separations: a guide to using cyclodextrin bonded phases for liquid chromatography*. Whippany: Advanced Separation Technologies, 1997. 46p.
46. DAICEL Chemical Industries, Japan In: CHIRAL Technologies. Technical support, products and services for chiral analysis and separation. Exton, s.d. 7p. Disponível em: <http://www.daicel.co.jp> Acesso em: 29 out. 1998.
47. DALGLIESH, C.E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.*, London, oct., p.3940-3942, 1952.
48. DAPPEN, R., ARM, H., MAYER, V.R. Applications and limitations of commercially available chiral stationary phases for high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.373, p.1-20, 1986.

49. DARMON, A., THENOT, J.P. Determination of betaxolol enantiomers by high-performance liquid chromatography: application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.374, p.321-328, 1986.
50. DAVANKOV, V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? *Chirality*, New York, v.9, p.99-102, 1997.
51. DAVIES, N.M. Methods of analysis of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.691, p.229-261, 1997.
52. DeCAMP, W.H. The FDA perspective on the development of stereoisomers. *Chirality*, New York, v.1, p.2-6, 1989.
53. DHULST, A., VERBEKE, N. Chiral separation by capillary electrophoresis with oligosaccharides. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.608, p.275-287, 1992.
54. DEF 2000/2001 dicionário de especialidades farmacêuticas. 29.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2000. 1186p.
55. DOMENICI, E., BERTUCCI, C., SALVADORI, P., FELIX, G., CAHAGNE, I., MONTELLIER, S., WAINER, I.W. Synthesis and chromatographic properties of an HPLC chiral stationary phase based upon human serum albumin. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.29, p.170-176, 1990.
56. DURHAM, D.G. Application of force field calculations to the prediction of chirally discriminating chromatographic behaviour for β -CDs. *Chirality*, New York, v.8, p.58-66, 1996.
57. EGGINGER, G., LINDNER, W., KAHR, S., STOSCHITZKY, K. Stereoselective HPLC bioanalysis of atenolol enantiomers in plasma: application to a comparative human pharmacokinetic study. *Chirality*, New York, v.5, p.505-512, 1993.
58. EGGINGER, G., LINDNER, W., VANDENBOSCH, C., MASSART, D. Enantioselective bioanalysis of β -blocking agents: focus on atenolol, betaxolol, carvedilol, metoprolol, pindolol, propranolol and sotolol. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.7, p.277-295, 1993.
59. EKBORG-OTT, K.H., LIU, Y., ARMSTRONG, D.W. Highly enantioselective HPLC separations using the covalent bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase. *Chirality*, New York, v.10, p.434-483, 1998.
60. EKELUND, J., ARKENS, A.V., BRONNUM-HANSEN, K., FICH, K., OLSEN, L., PETERSON, P.V. Chiral separations of β -blocking drug substances using chiral stationary phases. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.708, p.253-261, 1995.

61. ENQUIST, M., HERMANSSON, J. Separation of the enantiomers of beta-receptor blocking agents and other cationic drugs using a CHIRAL-AGP column. Binding properties and characterization of immobilized acid glycoprotein. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.519, p.285-298, 1990.
62. ERIKSSON, T. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, New York, v.7, p.44-52, 1995.
63. ERLANDSSON, P., MARLE, I., HANSSON, L., ISAKSSON, R., PETTERSON, C., PETTERSON, G. Immobilized celulase (CBH-I) as a chiral stationary phase for direct resolution of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v.112, p.4573-4574, 1990.
64. EUROPEAN Pharmacopoeia. 3.ed. Strasbourg: Council of Europe, 1996. p. 19, 418-419, 480-481, 1001-1002, 1192-1194, 1336-1337 (European Treaty series, n.50).
65. EVANS, A.M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.36, p.7S-15S, 1996.
66. EVANS, A.M. Enantioselective pharmacodynamics and pharmacokinetics of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur. J. Clin Pharmacol.*, Berlin, v.42, p.237-256, 1992.
67. FARMACOPÉIA brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. 1213p.
68. FARKAS, G., IRGENS, L.H., QUINTERO, G., BEESON, M.D., AL-SAEED, A., VIGH, G. Displacement chromatography on cyclodextrin silicas. IV. Separation of the enantiomers of ibuprofen. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.645, p.67-74, 1993.
69. ESTADOS UNIDOS. National Archives and Records Administration. Office of the Federal Register. *Code of federal regulations*. Washington: U.S. Government Printing Office, 1997. v.62, n.227.
70. FERRETI, R., GALLINELLA, B., TORRE, L.A.F., VILLANI, C. Direct high performance liquid chromatography resolution on chiral columns of tiaprofenic acid and related compounds in bulk powder and pharmaceutical formulations. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.704, p.217-223, 1995.
71. FORNSTEDT, T., HESSELGREN, A.M., JOHANSSON, M. Chiral assay of atenolol present in macrodialysis and plasma samples of rats using chiral CBH as stationary phase. *Chirality*, New York, v.9, p.329-334, 1997.
72. FOYE, W.O., ed. *Principles of medicinal chemistry*. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.51-52.
73. FRANCOTTE, E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p.379-397, 2001.
-
- Separação enantiomérica de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida com fase estacionária quiral
Anil Kumar Singh – Tese para obtenção do grau de DOUTOR FCF/USP 2002
74. ... AND ENANTIOMERS IN BIOLOGICAL FLUIDS. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.491, p.139-149, 1989.
80. GEISSLINGER, G., MENZEL-SOGLOWEK, S., SCHUSTER, O., BRUNE, K. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of flurbiprofen in human plasma. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.573, p.163-167, 1992.
81. GEISSLINGER, G., SCHAIBLE, H.G. New insights into the site and mode of antinociceptive action of flurbiprofen enantiomers. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.36, p.513-520, 1996.
82. GILAR, M., TESAROVA, E., DEYL, Z. Influence of mobile phase composition on retention

74. FRANCOTTE, E., DAVATZ, A., RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.686, p.77-83, 1996.
75. FUKUHARA, T., ISOYAMA, M., SHIMADA, A., ITOH, M., YUASA, S. Resolution of 6 polar dl-amino acids by chromatography on native cellulose. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.387, p.562-565, 1987.
76. FUKUSHIMA, T., MURAYAMA, K., SANTA, T., HOMMA, H., IMAI, K. Enantiomeric separation of d-/l -norepinephrine and -epinephrine by high-performance liquid chromatography with a β -cyclodextrin type chiral stationary phase. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.12, p.1-3, 1998.
77. GASKELL, R.M., CROOKS, B. Practical strategy for the analytical separation of enantiomers by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.553, p.357-363, 1991.
78. GASPER, M.P., BERTHOD, A., NAIR, U.B. ARMSTRONG, D.W. Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations. *Anal. Chem.*, Columbus, v.68, p.2501-2514, 1996.
79. GEISSLINGER, G., DIETZEL, K., LOEW, D., SCHUSTER, O., RAU, G., LACHMANN, G., GRUNE, K. High-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen, its metabolites and enantiomers in biological fluids. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.491, p.139-149, 1989.
80. GEISSLINGER, G., MENZEL-SOGLOWEK, S., SCHUSTER, O., BRUNE, K. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of flurbiprofen in human plasma. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.573, p.163-167, 1992.
81. GEISSLINGER, G., SCHAIBLE, H.G. New insights into the site and mode of antinociceptive action of flurbiprofen enantiomers. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.36, p.513-520, 1996.
82. GILAR, M., TESAROVA, E., DEYL, Z. Influence of mobile phase composition on retention and enantio-separation of profens in HPLC on the beta-cyclodextrin stationary phases. *Chem. Listy, Praha*, v.90, p.461-466, 1996.
83. GÖRÖG, S., GAZDAG, M. Enantiomeric derivatization for biomedical chromatography. *J. Chromatogr., B.: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.659, p.51-84, 1994.
84. GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, Columbus, v.68, p.A305-A309, 1996.

85. HAGINAKA, J., MIYANO, Y., SAIZEN, Y., SEYAMA, C., MURASHIMA, T. Separation of enantiomers on a pepsin-bonded column. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.708, p.161-168, 1995.
86. HAGINAKA, J., MURASHIMA, T., SEYAMA, C. Separation of enantiomers on a lysozyme bonded silica column. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.666, p.203-210, 1994.
87. HAGINAKA, J., SEYAMA, C., KANASUGI, N. The absence of chiral recognition ability in ovomucoid: ovoglycoprotein-bonded hplc stationary phases for chiral recognition. *Anal. Chem.*, Columbus, v.67, p.2539-2547, 1995.
88. HAN, S.M., HAN, Y.I., ARMSTRONG, D.W. Structural factors affecting chiral recognition and separation on beta-cyclodextrin bonded phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.441, p.376-381, 1988.
89. HAN, S.M. Direct enantiomeric separations by high performance liquid chromatography using cyclodextrins. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.11, p.259-271, 1997.
90. HE, J., SHIBUKAWA, A., NAKAGAWA, T., WADA, H., FUJIMA, H., IMAI, E., GO-OH, Y. Direct injection analysis of atenolol enantiomers in plasma using an achiral-chiral coupled column HPLC system. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.41, p.544-548, 1993.
91. HERMANSSON, J., ERIKSSON, M. Direct liquid-chromatographic resolution of acidic drugs using a chiral alpha-1-acid glycoprotein column (enantiopac) *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.9, p.621-639, 1986.
92. HERMANSSON, J., HERMANSSON, I. Dynamic modification of the chiral bonding properties of a chiral-AGP column by organic and inorganic additives: separation of enantiomers of antiinflammatory drugs. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.666, p.181-191, 1994.
93. HERMANSSON, J., VON BAHR, C. Determination of (R)- and (S)-alprenolol and (R)- and (S)-metoprolol as their diastereomeric derivatives in human plasma by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.227, p.113-127, 1982.
94. HERRING, V.L., BASTIAN, T.L., LALONDE, R.L. Solid phase extraction and direct high performance liquid chromatographic determination of metoprolol enantiomers in plasma. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.567, p.221-227, 1991.
95. HILTON, M.L., ARMSTRONG, D.W. In: DUCHENE, D., ed. *New trends in cyclodextrins and derivatives*. 1991. P.536.
96. HOFFMAN, B.B., LEFKOWITZ, R.J. In: HARDMAN, J.G., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, A.G. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 1905p.

97. HSYU, P.H., GIACOMINI, K.M. High performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of beta-adrenoceptor blocking agents in biological fluids. I. Studies with pindolol. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.75, p.601-605, 1986.
98. HUBERT, Ph., CHIAP, P., CROMMEN, J., BOULANGER, B., CHAPUZET, E., MERCIER, N., BERVOAS-MARTIN, S., CHEVALIER, P., GRANDJEAN, D., LAGORCE, P., LALLIER, M., LAPARRA, M.C., LAURENTIE, M., NIVET, J.C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington conference to the laboratory *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.391, p.135-148, 1999.
99. HUTT, A.J., CALDWELL, J. The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acid: a novel route with pharmacological consequences. *J. Pharm. Pharmacol.*, Wallingford, v 35, p.693-704, 1983.
100. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Text on validation of analytical procedures. Disponível em: www.ifpma.org/pdfifpma/q2a.pdf. Acesso em: 27 set. 2001.
101. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE: ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: methodology. Disponível em: www.ifpma.org/pdfifpma/q2b.pdf. Acesso em: 27 set. 2001.
102. ITOH, T., YAMADA, H. Diastereomeric β -lactam antibiotics: analytical methods, isomerization and stereoselective pharmacokinetics. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.694, p.195-208, 1995.
103. IWAKI, K., BUNRIN, T., KAMEDA, Y., YAMAZAKI, M. Resolution and sensitive detection of carboxylic acid enantiomers using fluorescent chiral derivatization reagents by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.662, p.87-93, 1994.
104. JAMALI, F., COLLINS, D.S., BERRY, B.W., MOLDER, S., CHEUNG, R., MCCOLL, K., CHEUNG, H. Comparative bioavailability of two flurbiprofen products: stereoselective versus conventional approach. *Biopharm. Drug Dispos.*, Bognor Regis, v.12, p.435-445, 1991.
105. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.19, p 719-736, 1996.

106. JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.19, p.737-757, 1996.
107. JEPPSSON, A.B., JOHANSSON, U., WALDECK, B. Steric aspects of agonism and antagonism at beta-adrenoceptors: experiments with the enantiomers of terbutaline and pindolol. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Kobenhavn, v.54, p.285-291, 1984.
108. KAIDA, Y., OKAMOTO, Y. Efficient optical resolution of 4-hydroxy-2-cyclopentenone derivatives by hplc on 1-phenylethylcarbamates of cellulose and amylose. *Chem. Lett.*, Tokyo, v.1, p.85-88, 1992.
109. KARGER, A.E., STOLL, E., HANSEL, W. Direct chiral separation of tiaprofen, carprofen and flurbiprofen by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Pharmazie*, Eschborn, v.49, p.155-159, 1994.
110. KENNEDY, J.H. Comparison of chiral separations on polysaccharide chiral stationary phases to an improved Pirkle phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.725, p.219-224, 1996.
111. KIRCHHOEFER, R.D., SULLIVAN, G.M., ALLGIRE, J.F. Analysis of USP epinephrine injections for potency, impurities, degradation products and d-enantiomer by liquid chromatography, using ultraviolet and electrochemical detectors. *J. -Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.68, n.2, p.163-165, 1985.
112. KIRKLAND, K.M. Optimization of chiral selectivity on cellulose based high-performance liquid chromatographic columns using aprotic mobile phase modifiers. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.718, p.9-26, 1995.
113. KIRKLAND, K.M., NEILSON, K.L., McCOMBS, D.A. Comparison of a new ovomucoid and a 2nd-generation alpha-1-acid glycoprotein based chiral column for the direct high performance liquid chromatography resolution of drug enantiomers. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.545, p.43-58, 1991.
114. KNADLER, M.P., HALLS, D. High-performance liquid chromatographic analysis of the enantiomers of flurbiprofen and its metabolites in plasma and urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.494, p.173-182, 1989.
115. KOFAHL, B., HENKE, D., MUTSCHLER, E. Direct enantiospecific HPLC bioanalysis of (R,S)-atenolol on a chiral stationary phase. *Chirality*, New York, v.5, p.479-82, 1993.
116. KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.338

117. KRSTULOVIC, A.M., FOUCHET, M.H., BURKE, J.T., GILLET, G., DURAND, A. Direct enantiomeric separation of betaxolol with applications to analysis of bulk drug and biological samples. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.452, p.477-483, 1988.
118. KRULL, I.S. The liquid-chromatographic resolution of enantiomers. In: GIDDINGS, J.C., GRUSHKA, E., CAZES, J., BROWN, P.R., eds. *Advances in chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1978. v.16, p.175-210.
119. LAMPRECHT, G., KRAUSHOFER, T., STOSCHITZKY, K., LINDNER, W. Enantioselective analysis of (R)- and (S)-atenolol in urine samples by a high-performance liquid chromatography column-switching setup. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.740, p.219-226, 2000.
120. LEE, E.J.D., WILLIAMS, K.M. Chirality: clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.18, p.339-345, 1990.
121. LELOUX, M.S. Rapid chiral separation of metoprolol in plasma: application to the pharmacokinetics/pharmacodynamics of metoprolol enantiomers in the conscious goat. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.6, p.99-105, 1992.
122. LI, F., COOPER, S.F., CÔTÉ, M. Determination of the enantiomers of metoprolol and its major acidic metabolite in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.668, p.67-75, 1995.
123. LINDNER, W.F. Enantioselective chromatography: selection of chiral recognition models. *Mikrochim. Acta*, Wien, v.2, p.113-128, 1991.
124. LINDNER, W.F., HIRSCHBOCK, J. Chromatographic resolution of amino acids using tartaric acid mono-N-octylamide as mobile phase additive. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.9, p.551-571, 1986.
125. LINDNER, W.F., PETTERSSON, C. Resolution of optical isomers by liquid chromatographic techniques In: WAINER, I. ED. *Liquid chromatography in pharmaceutical development*. Springfield: Aster, 1985. p. 63-133.
126. LOFTUS, B.T., NASH, R.A., eds. Pharmaceutical process validation: analytical methods validation. New York: Macel Dekker, 1984. p.251-266. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.23).
127. LOTSCH, J., GEISSLINGER, G., MOHAMMADIAN, P., BRUNE, K., KOBAL, G. Effects of flurbiprofen enantiomers on pain-related chemosomato-sensory evoked potentials in human subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Oxford, v.40, p.339-346, 1995.

128. MASSOLINI, G., DELORENZI, E., PONCI, M.C., GANDINI, C., CACCIALANZA, G., MONACO, H.L. Egg-yolk riboflavin binding-protein as a new chiral stationary-phase in high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.704, p.55-65, 1995.
129. MATLIN, S.A., TRITAN, M.E., CASS, Q.B. BOYD, D.R. Enantiomeric resolution of chiral sulfoxides on polysaccharide phases by HPLC. *Chirality*, New York, v.8, p.147-152, 1996.
130. MCCARTHY, J.P. Direct enantiomeric separation of the four stereoisomers of nadolol using normal-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatography with Chiralpak AD. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.685, p.349-355, 1994.
131. McDANIEL, D.M., SNIDER, B.G. Resolution of α -arylacetic acid enantiomers on two chiral stationary phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.404, p.123-132, 1987.
132. McDOWALL, R.D. The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.391, p.149-158, 1999.
133. MEHTA, A.C. Quality management in drug analysis. *Analyst*, Cambridge, v.122, p.83R-88R, 1997.
134. MEHVAR, R., BROCKS, D.R. Steriospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrinargic blockers in humans. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, Edmonton, v.4, p.185-200, 2001.
135. MEHVAR, R., JAMALI, F. Bioequivalence of chiral drugs: stereospecific versus non-stereospecific methods. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, v.33, p.122-141, 1997.
136. MERCK index. 12.ed. Withehouse Station, 1996 p. 145-146, 198-199, 712, 839, 1050, 1089, 1280.
137. MARLE, I., ERLANDSSON, P., HANSSON, L., ISAKSSON, R., PETTERSSON, C., PETTERSSON, G. Separation of enantiomers using cellulase (CBH-I) silica as a chiral stationary phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.586, p.233-248, 1991.
138. MESECAR, A.D., KOSHLAND, D.E. A new model for protein stereospecificity. *Nature*, London, v.403, p.614-615, 2000.
139. MEZEL-SOGLOWEK, S., GEISSLINGER, G., BRUNE, K. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketoprofen, ibuprofen and fenoprofen in plasma using a chiral alpha-1-acid glycoprotein column *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.532, p.295-303, 1990.
140. MISTRY, B., LESLIE, J.L., EDDINGTON, N.D. Enantiomeric separation of metoprolol and alpha hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.758, p.153-161, 2001.

141. MIWA, T., ICHIKAWA, M., TSUNO, M., HATTORI, T., MIYAKAWA, T., KAYANO, M., MIYAKE, Y. Direct liquid-chromatographic resolution of racemic compounds: use of ovomucoid as a column ligand. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.35, p.682-686, 1987.
142. MIWA, T., MIYAKAWA, T., KAYANO, M., MIYAKE, Y. Application of an ovomucoid-conjugated column for the optical resolution of some pharmaceutically important compounds. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.408, p.316-322, 1987.
143. MIWA, T., MIYAKAWA, T., MIYAKE, Y. Characteristics of an avidin conjugated column in direct liquid chromatographic resolution of racemic compounds. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.457, p.227-233, 1988.
144. NAGAMATSU, S., MURAZUMI, K., MAKINO, S. Chiral separation of a pharmaceutical intermediate by a simulated moving bed process. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.832, p.55-65, 1999.
145. NATHANSON, J.A. Steriospecificity of beta adrenergic antagonists: R-enantiomers show increased selectivity for beta-2 receptors in ciliary process. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.245, p.94-101, 1988.
146. NOCTOR, T.A.G., FELISE, G., WAINER, I.W. Stereochemical resolution of enantiomeric 2-aryl propionic acid NSAID on human serum albumin based hplc chiral stationary phase. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.31, p.55-59, 1991.
147. OI, N., KITAHARA, H., AOKI, F., KISU, N. Direct separation of carboxylic-acid enantiomers by high-performance liquid-chromatography with amide and urea derivatives bonded to silica-gel as chiral stationary phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.689, p.195-201, 1995.
148. OI, N., NAGASE, M., INDA, Y., DOI, T. High performance liquid chromatography separation of enantiomers on (S)-2-(4-chlorophenyl) isovaleric acid and its amide derivatives bonded to silica gel. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.265, p.111-116, 1983.
149. OKAMOTO, Y., ABURATANI, R., KAIDA, Y., HATADA, K., INOTSUME, N., NAKANO, M. Direct chromatographic separation of 2-aryl propionic acid enantiomers using tris-3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases. *Chirality*, New York, v.1, p.239-242, 1989.
150. OKAMOTO, Y., KAIDA, Y. Resolution by high performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.666, p.403-419, 1994.

151. OKAMOTO, Y., KAWASHIMA, M., HATADA, K. Useful chiral packing materials for high-performance liquid-chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica-gel. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v.106, p.5357-5359, 1984.
152. OKAMOTO, Y., KAWASHIMA, M., HATADA, K. Chromatographic resolution. 11. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica-gel. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.363, p.173-186, 1986.
153. OKUMURA, T., NAKAJIMA, Y., MATSUOKA, M., TAKAMATSU, T. Study of salivary catecholamines using fully automated column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.694, p.305-316, 1997.
154. OLIVEROS, L., LOPEZ, P., MINGUILLON, C., FRANCO, P. Chiral chromatographic discrimination ability of a cellulose 3, 4 dimethyl-phenylcarbamate/10-undecenoate mixed derivative fixed on several chromatographic matrices. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.18, p.1521-1532, 1995.
155. OLSOVSKA, J., FLIEGER, M., BACHECHI, F., MESSINA, A., SINIBALDI, M. Direct resolution of optically active isomers on chiral packings containing ergoline skeleton. 6. Enantioseparation of profens. *Chirality*, New York, v.11, p.291-300, 1999.
156. PEARSON, A.A., GAFFNEY, T.E., WALLE, T., PRIVITERA, P.J. A stereoselective hypotensive action of atenolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.250, p.759-763, 1989.
157. PEDRAZZINI, S., ZANOBONIMUCIACCIA, W., FORGIONE, A. Determination of the nonsteroidal antiinflammatory drug flunoxaprofen, S(+)-2-(4-fluorophenyl)-alpha-methyl-5-benzoxazoleacetic acid, in blood and urine by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.413, p.338-341, 1987.
158. PEHOURECQ, F., JARRY, C., BANNWARTH, B. Chiral resolution of flurbiprofen and ketoprofen enantiomers by HPLC on a glycopeptide type column chiral stationary phase. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.15, p.217-222, 2001.
159. PERSSON, B.A., ANDERSSON, S. Unusual effect of separation conditions on chiral separations. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p.195-203, 2001.
160. PETERSEN, P.V., EKELUND, J., OLSEN, L., OVESEN, S.V. Chiral separations of beta-blocking drug substances using the Pirkle-type alpha-Burke 1 chiral stationary phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.757, p.65-71, 1997.
161. PETTERSSON, C., SCHILL, G. Separation of enantiomers in ion-pair chromatographic systems. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.9, p.269-290, 1986.

162. PETTERSSON, K.J., OLSSON, A. Liquid chromatographic determination of enantiomers of ibuprofen in plasma using a chiral AGP column. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.563, p.414-418, 1991.
163. PHEM-HUY, C., RADENEN, B. High performance liquid chromatographic determination of (S) and (R)- propranolol in human plasma and urine with a chiral β -cyclodextrin bonded phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.665, p.125-132, 1995.
164. PIPERAKI, S., TSANTILI KAKOULIDOU, A., PARISSI POULOU, M. Solvent selectivity in chiral chromatography using a beta-cyclodextrin-bonded phase. *Chirality*, New York, v.7, p.257-266, 1995
165. PIRKLE, W.H., BURKE, J.A. Chiral stationary phase designed for beta-blockers. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.557, p.173-185, 1991.
166. PIRKLE, W.H., FINN, J.M., SCHREINER, J.L., HAMPER, B.C. A widely useful chiral stationary phase for the high performance liquid chromatography separation of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v.103, p.3964-3966, 1981
167. PIRKLE, W.H., McCUNE J.E. Discussion of a controversial chiral recognition model. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.469, p.67-75, 1989.
168. PIRKLE, W.H., POCHAPSKY, T.C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chem. Rev.*, Washington, v.89, n.2, p.347-362, 1989.
169. PIRKLE, W.H., POCHAPSKY, T.C., BURKE, J.A., DEMING, K.C. Systematic studies of chiral recognition mechanism. In: STEVENSON, D., WILSON, I.D., eds. *Chiral separations*. New York: Plenum Press, 1988. p. 23-35. (Chromatographic Society Symposium on Chiral Separations, University of Surrey, 1987).
170. PIRKLE, W.H., WELCH, C.J. An improved chiral stationary phase for the chromatographic-separation of underivatized naproxen enantiomers. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.15, p.1947-1955, 1992.
171. RAWJEE, Y.Y., WILLIAMS, R.L., VIGH, G. Capillary electrophoretic chiral separations using cyclodextrin additives. 3. Peak resolution surfaces for ibuprofen and homatropine as a function of the pH and the concentration of beta-cyclodextrin. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.680, p.599-607, 1994.
172. ROMPAY, J.V. ICH analytical method validation: experience of European industry. In: AOAC INTERNATIONAL ANNUAL "IMPLEMENTATION OF ICH VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES FOR PHARMACEUTICALS", 112, Montreal, 1998. Montreal: AOAC, 1998. p.1-5.

173. RUDY, A.C., ANLIKER, K.S., HALL, S.D. High-performance liquid-chromatographic determination of the stereoisomeric metabolites of ibuprofen. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.528, p.395-405, 1990.
174. RUTLEDGE, D.R., GARRICK, C. Rapid high-performance liquid-chromatographic method for the measurement of the enantiomers of metoprolol in serum using a chiral stationary phase. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.497, p.181-190, 1989.
175. SANTORO, M.I.R.M. *Introdução ao controle de qualidade de medicamentos: substâncias químicas de referência e padrões de substâncias biológicas*. São Paulo: Atheneu, 1988 p.27-39.
176. SANTORO, M.I.R.M. Cromatografia líquida em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.28, p.1-29, 1992.
177. SANTORO, M.I.R.M., CHO, H.S. Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência em fase quiral na análise de medicamentos. *Rev. Racine*, São Paulo, v.6, n.30, p.10-12, 1996.
178. SANTORO, M. I. R. M., SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v. 37, no. 3, p. 259-268, 2001.
179. SCHILL, G., WAINR, W., BARKAN, S.A. Chiral separation of cationic drugs on an alpha-1-acid glycoprotein bonded stationary phases. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.9, p.641-666, 1986.
180. SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p.275-299, 2001.
181. SILBER, B., RIEGELMAN, S. Stereospecific assay for (-) and (+)-propranolol in human and dog plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bethesda, v.215, p.643-648, 1980.
182. SINGH, A. K., KEDOR-HACKMANN, E. R. M., SANTORO, M. I. R. M.. Development and validation of chiral HPLC method for quantitative analysis of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. INTERNATIONAL* v.84, p. 1724-1729, 2001.
183. SINGH, N.N., PASUTTO, F.M., COUTTS, R.T., JAMALI, F. Gas chromatographic separation of optically active anti-inflammatory 2-arylpropionic acids using (+)- or (-)-amphetamine as derivatizing reagent. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.378, p.125-135, 1986.
184. SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L., KERN, J., KIRKLAND, K. Chiral separations. In: SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. *Practical HPLC method development*. 2.ed. New York: Wiley, 1997. p.537-615.

185. SORENSEN, A.M. Requirements of the quality of chiral drug substances. *Acta Pharm. Nord.*, Stockholm, v.2, p.181-184, 1990.
186. SRINIVAS, N.R., BARR, W.H., SHYU, W.C., MOHANDOSS, E., CHOW, S., STAGGERS, J., BALAN, G., BELAS, F.J., BLAIR, I.A., BARBHAIYA, R.H. Bioequivalence of two tablet formulations of nadolol using single and multiple dose data: assessment using stereospecific and nonstereospecific assays. *J. Pharm. Sci.*, New York, v.85, p.299-303, 1996.
187. STINSON, S.C. Chiral chemistry: driven by the needs of the drug industry and fueled by the ingenuity of chemists, sales of single-enantiomer chiral compounds keep accelerating. *Chem. Eng. News*, Columbus, v.79, p.45-57, 2001.
188. STOSCHITZKY, K., EGGINGER, G., ZERNIG, G., KLEIN, W., LINDNER, W. Stereoselective features of (R)-atenolol and (S)-atenolol clinical pharmacological, pharmacokinetic and radioligand binding studies. *Chirality*, New York, v.5, p.15-19, 1993.
189. STOSCHITZKY, K., KAHR, S., DONNERER, J., SCHUMACHER, M., LUHA, O., MAIER, R., KLEIN, W., LINDNER, W. Stereoselective increase of plasma concentrations of the enantiomers of propranolol and atenolol during exercise. *Clin. Pharmacol. Ther.*, Saint Louis, v.57, p.543-551, 1995.
190. STRAKA, R.J., JOHNSON, K.A., MARSHALL, P.S., REMMEL, R.P. Analysis of metoprolol enantiomers in human serum by liquid chromatography on a cellulose-based chiral stationary phase. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.530, p.83-93, 1990.
191. STRANDBERG, A., NYSTROM, A., BEHR, S., KARLSSON, A. Use of immobilized amyloglucosidase as chiral selector in chromatography: control of enantioselective retention and resolution in liquid chromatography. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.50, p.215-222, 1999.
192. SUBERT, J. Progress in the separation of enantiomers of chiral drugs by HPLC without their prior derivatization. *Pharmazie*, Eschborn, v.49, n.H1, p.3-12, 1994.
193. SVENSSON, S., VESSMAN, J., KARLSSON, A. Direct high performance liquid chromatographic separation of metoprolol analogues on a chiralcel OD column using chemometrics. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.839, p.23-39, 1999.
194. SWARTZ, M.E., KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharm. Technol. Ed. Bras.*, v.2, p.12-20, 1998.

195. SYBILSKA, D., ZUKOWSKI, J., BOJARSKI, J. Resolution of mephénytoin and some chiral barbiturates into enantiomers by reversed phase high performance liquid chromatography via beta-cyclodextrin inclusion complexes. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.9, p.591-606, 1986.
196. TACHIBANA, K., OHNISHI, A. Reversed phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p.127-154, 2001.
197. TAKASHIA, A. Chiral separation of pharmaceuticals possessing a carboxy moiety. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.717, p.295-311, 1998.
198. TANG, Y. Significance of mobile phase composition in enantio-separation of chiral drugs by HPLC on a cellulose based chiral stationary phase. *Chirality*, New York, v.8, p.136-142, 1996.
199. TANG, Y., ZIELINSKI, W.L., BIGOTT, H.M. Separation of nicotine and normicotine enantiomers via normal phase HPLC on derivatized cellulose chiral stationary phases *Chirality*, New York, v.10, p.364-369, 1998.
200. TERFLOTH, G.J. Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p.301-307, 2001.
201. TERFLOTH, G.J., PIRKLE, W.H., LYNAM, K.G., NICOLAS, E.C. Broadly applicable polysiloxane-based chiral stationary-phase for high-performance liquid-chromatography and supercritical-fluid chromatography. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.705, p.185-194, 1995.
202. THEOLOHAN, S., JADAUD, P., WAINER, I.W. Immobilized enzymes as chromatographic phases for HPLC: the chromatography of free and derivatized amino acids on immobilized trypsin. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.28, p.551-555, 1989.
203. TRIPATHI, K.D. *Essentials of medical pharmacology*. 2.ed. New Delhi: Jaypee Brothers, 1991. p.109-128.
204. UNITED States Pharmacopeia: USP 24. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.949-951, 2149-2152.
205. VAN-OVERBEKE, A., BAEYENS, W., DEWAELE, C. Comparative study on the enantiomeric separation of several non-steroidal anti-inflammatory drugs on two cellulose-based chiral stationary phases. *J. Liq. Chromatogr.*, New York, v.18, p.2427-2443, 1995.
206. VAN-OVERBEKE, A., BAEYENS, W., VANDENBOSSCHE, W., DEWAELE, C. Separation of 2-arylpropionic acids on a cellulose-based chiral stationary-phase by RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.12, p.901-909, 1994.

207. VERMEULEN, B., REMON, J.P. Validation of a high performance liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen enantiomers in plasma of broiler chickens. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.749, p.243-251, 2000.
208. VIGH, G., QUINTERO, G., FARKAS, G. Displacement chromatography on cyclodextrin silicas.3. Enantiomer separations. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.506, p.481-493, 1990.
209. WAINER, I.W. HPLC chiral stationary phases for the stereochemical resolution of enantiomeric compounds, the current state of the art. In: _____. *Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology*. 2.ed. New York: Dekker, 1993. p.139-182. (Clinical pharmacology, v.18).
210. WAINER, I.W., DOYLE, T.D. Application of high-performance liquid-chromatographic chiral stationary phases to pharmaceutical analysis: structural and conformational effects in the direct enantiomeric resolution of alpha-methylarylacetic acid anti-inflammatory agents. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.284, p.117-124, 1984.
211. WAINER, I.W., DRAYER D.E. *Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology*. New York: Dekker, 1988. 424p. (Clinical pharmacology, v.11).
212. WAINER, I.W., JADAUD, P., SCHOMBAUM, G.R., KADODKAR, S.V., HENRY, M.P. Enzymes as HPLC stationary phases for chiral resolutions initial investigations with alpha-chymotrypsin. *Chromatographia*, Wiesbaden, v.25, p.903-907, 1988.
213. WAINER, I.W., STIFFIN, R.M., CHU, Y.Q. Drug analysis using HPLC chiral stationary phases: where to begin and which to use. In: STEVENSON, D., WILSON, I.D., eds. *Chiral separations*. New York: Plenum Press, 1988. p.11-21. (Chromatographic Society Symposium on Chiral Separations, University of Surrey, 1987).
214. WALLE, T., WALLE, U.K., WILSON, M.J., FAGAN, T.C., GAFFNEY, T.E. Stereoselective ring oxidation of propranolol in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, Oxford, v.18, p.741-748, 1984.
215. WARD, T.J., ARMSTRONG, D.W. Cyclodextrin stationary phases. In: ZIEF, M., CRANE, L.J. *Chromatographic chiral separations*. New York: Marcel Dekker, 1988. p.131-163.
216. WARD, T.J., FARRIS III, A.B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p. 73-89, 2001.
217. WARD, T.J., OSWALD, T.M. Enantioselectivity in capillary electrophoresis using macrocyclic antibiotics. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.792, p.309-325, 1997.

218. WECHTER, W.J. Drug chirality: on the mechanism of R-aryl propionic acid class NSAIDs: epimerization in humans and the clinical implications for the use of racemate. *J. Clin. Pharmacol.*, Thousand Oaks, v.34, p.1036-1042, 1994.
219. WELCH, C.J. Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.666, p.3-26, 1994.
220. WELCH, C.J., PERRIN, S.R. Improved chiral stationary phase for β -blocker enantioseparations. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.690, p.218-225, 1995.
221. WELCH, C.J., SZCZERBA, T., PERRIN, S.R. Some recent high-performance liquid chromatography separations of the enantiomers of pharmaceuticals and other compounds using the Whelk-O 1 chiral stationary phase. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.758, p.93-98, 1997.
222. WENG, N.D., LEE, J.W. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the quantitation of warfarin in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.11, p.785-792, 1993.
223. Chiral HPLC. Separations of Chiral HPLC sorbents. Disponível em: <http://www.merck.de/englis/serices/chromatographic/index.htm>. Acesso em: 29 out. 1998.
224. Chemical Analysis Online Store. LC Columns.Mode: Chiral. Bland: Chiradex. Sorbent: Chiradex. Disponível em: http://www.chem.agilent.com/scripts/cabu/p2_cas_lccolides.asp?groupid=961&smode=Chiral&brand=Chiradex&sorbent=Chiradex&bmode=Chiral. Acesso em: 29 out. 1998.
225. YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.906, p.105-125, 2001.
226. YASHIMA, E., YAMAMOTO, C., OKAMOTO, Y. NMR studies of chiral discrimination relevant to the liquid chromatographic enantioseparation by a cellulose phenylcarbamate derivative. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v.118, p.4036-4048, 1996.
227. ZHANG, H., STEWART, J.T., UJHELYI, M. High-performance liquid chromatographic analysis of pindolol enantiomers in human serum and urine using a reversed-phase cellulose-based chiral column. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.668, p.309-313, 1995.

10. PUBLICAÇÕES

10.1 TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

10.1.1 SINGH, A.K.; SANTORO, M.I.R.M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Validação de metodologia para separação de enantiômeros de metoprolol. In 1º CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO RIO DE JANEIRO – QUALIDADE E INTEGRAÇÃO NA AMÉRICA LATINA, Hotel Glória, Rio de Janeiro, Brasil, 4-7 de junho de 1999.

10.1.2 MARIA INÊS R. M. SANTORO ; ANIL K. SINGH; MAYA HASEGANA ; MARTIN STEPPE ; ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN. Enantiomeric separation of beta-blockers in pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography using chiral stationary phases. In: 113th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition. Adam's Mark - Houston Hotel, Houston, Texas, USA, September 26-30, 1999.

10.1.3 ANIL K. SINGH ; MARIA INÊS R. M. SANTORO. Direct high-performance liquid-chromatographic analysis of beta-blockers in pharmaceutical formulations using a chiral stationary phases. In: XIV Seminário de Pós-graduação, IV semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil, 18-22 de outubro de 1999.

- 10.1.4 A. K. SINGH ; E. R. M. KEDOR-HACKMANN ; M. I. R. M. SANTORO. Separação enantiomérica do metoprolol utilizando fase estacionária quiral: validação de método analítico para aplicação em amostra comercial. In: II Encontro Nacional de Ensino em Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos. Simpósio Internacional em Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS Brazil, 30 de Julho a 2 de agosto de 2000.
- 10.1.5 ANIL K. SINGH ; ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN & MARIA INÊS R. M. SANTORO Direct HPLC Separation of beta-blockers on cellulose tris-3, 5-dimethylphenyl carbamate column: studies with atenolol. In: 114th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting and Exposition Adam's Mark Philadelphia Hotel, Philadelphia, Pennsylvania, USA, September 10-14, 2000.
- 10.1.6 ANIL KUMAR SINGH & MARIA INÊS R. M. SANTORO. Direct high-performance liquid-chromatographic enantiomeric separation of pindolol utilizing chiral stationary phases. In: XV Seminário de Pós-graduação, V semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil, 16-20 de outubro de 2000.
- 10.1.7 A. K. SINGH & M. I. R. M. SANTORO Enantiomeric separation and retention behavior of beta-blockers on Pirkle type column. In: 3rd Congress of Pharmaceutical Sciences. Águas de Lindóia, SP, Brazil. April 8-11, 2001.
- 10.1.8 A. K. SINGH ; E. R. M. KEDOR-HACKMANN ; M. I. R. M. SANTORO The Pirkle type alpha-Burke 2 chiral stationary phase: enantiomeric separation and retention behavior of few beta-blockers. In: VI Pharmatech, International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology, III Annual meeting of the SBTf, III meeting of Pharmaceutical Quality Control-ENECQ. Recife Palace Lucsim Hotel-Recife-Pernambuco-Brazil. August 5-8, 2001.
- 10.1.9 ANIL K. SINGH, ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN & MARIA INÊS R. M. SANTORO. High performance liquid chromatographic separation of ibuprofen enantiomers using Whelk-O 1[®] as chiral stationary phase. In: XVII Seminário de Pós-graduação, VI Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brazil, 15-19 de outubro de 2001.

- 10.1.10 MARIA INÊS R. M. SANTORO, ANIL K. SINGH, ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN. Quantitative determination of flurbiprofen enantiomers in pharmaceutical formulation using whelk-O 1[®] as chiral stationary phase. In: Annual meeting and exposition AOAC Latin Caribbean section, Montevideo, Uruguay. 20-23 de novembro de 2001.

10.2 TRABALHOS PUBLICADOS E ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICOS NACIONAIS E INTERNACIONAIS

- 10.2.1 ANIL K. SINGH, ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN, MARIA INÊS R. M. SANTORO. Development and validation of chiral HPLC method for quantitative analysis of atenolol and metoprolol enantiomers in tablet preparations. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. INTERNATIONAL* v.84, no. 6, p 1724-1729, **2001**.
- 10.2.2 MARIA INÊS R. M. SANTORO & ANIL K. SINGH Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. *Brazilian J. Pharm. Sci.* v. 37, no. 3, p. 259-268, **2001**.
- 10.2.3 MARIA INÊS R. M. SANTORO. ANIL K. SINGH, ERIKA R. M. KEDOR-HACKMANN. Quantitative determination of flurbiprofen enantiomers in pharmaceutical formulation using Whelk-O 1[®] as chiral stationary phase. *Biomed. Chromatogr.* **2002**. (Enviado para publicação)