UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS
ÁREA DE PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS

SEPARAÇÃO, OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE
ENANTÔMEROS PUROS NO CONTROLE
ESTEREOESPECÍFICO DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS
CONTENDO BISOPROLOL

VIVIAN ALVES SILVÉRIO

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS
ÁREA DE PRODUÇÃO E CONTROLE FARMACÊUTICOS

**SEPARAÇÃO, OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE
ENANTÔMEROS PUROS NO CONTROLE
ESTEREOESPECÍFICO DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS
CONTENDO BISOPROLOL**

VIVIAN ALVES SILVÉRIO

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo

2011

Vivian Alves Silvério de Moura

**SEPARAÇÃO, OBTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DE ENANTÔMEROS
PUROS NO CONTROLE ESTEREOESPECÍFICO DE QUALIDADE DE
MEDICAMENTOS CONTENDO BISOPROLOL E CARVEDILOL**

Comissão Julgadora
De
Dissertação para obtenção do Mestre

Prof. Dr. Anil Kumar Singh
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2011

À Deus,

Minha razão de viver, e que nunca me abandonou,

nem mesmo quando me distanciei Dele.

Seu amor e misericórdia me fortalecem,

A Ti, toda a minha adoração e louvor.

*À minha amada e preciosa Mãe,
Responsável por tudo que sou hoje,
seu amor, carinho, dedicação, paciência...
Obrigada pelos “não”, quando eu queria ouvir “sim”,
Isso é educação, hoje eu entendo todos seus motivos, isso me faz
amá-la ainda mais.*

*Foram muitas dificuldades para chegar até aqui,
muitas abdições....
mas temos vencido todos os obstáculos,
e atingindo grandes vitórias.*

Te amo.

Ao Prof. Anil Kumar Singh,

pela orientação e toda paciência dispensada a mim.

Foram três anos de aprendizado e aprimoramento profissional.

Obrigada por acreditar em mim.

Ao Laboratório Avamiller de Cosméticos
por tornar possível minha dedicação a este projeto;
e por todas as oportunidades concedidas à carreira.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos que durante esta jornada estiveram comigo, e tornaram este período mais agradável e fácil.

Ao Eliezer pela simples existência na minha vida. Seu amor, carinho e colo foram essenciais todos os dias, principalmente nos dias de cansaço e stress.

A Vanessa e Carol que desde o início deste projeto me apoiaram muito... Foram duas “anjas” que Deus enviou na minha vida, sempre me ajudaram e ofereceram apoio sem pedir nada em troca.

À Vivi que por longos finais de semana de sol e calor me motivou e acompanhou no laboratório, sua força e atuação foram primordiais nestes últimos dias, e que dias....

À Mariana, Cibele, Túlia, Helen, Angel, Cintia e Michele pela amizade, carinho, conselhos, muitas risadas, pela troca de experiências e por todos bons momentos.

Aos colegas do laboratório de Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos pela amizade, troca de experiências e colaboração.

À funcionária Iria por toda atenção e ajuda. Foram muitas risadas...

As Professores Maria Inês R. M. Santoro , Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann e Maria Segunda Aurora Prado pela colaboração no desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de pós- graduação em Fármaco e Medicamento, todos os professores e funcionários pela grande oportunidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1 TALIDOMIDA: UMA TRAGÉDIA.....	28
3.1.1 Histórico.....	28
3.1.1.1 Focomiela	34
3.1.1.2 No Brasil	35
3.1.2 Síntese e Metabolismo	36
3.1.3 Quiralidade	38
3.1.4 Novas aplicações	40
3.2. β -BLOQUEADORES	41
3.3 BISOPROLOL	44
3.3.1 Farmacocinética	44
3.3.2 Farmacodinâmica	45
3.3.3 Enantiosseletividade do Bisoprolol.....	47
3.3.3 Produto Comercial.....	49

3.4 SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS QUIRAIS POR CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	50
3.4.1 Tipos de Separação Quiral.....	50
3.4.1.1 Método Indireto.....	50
3.4.1.2 Método Direto.....	52
3.4.2 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ).....	53
3.4.2.1 Fases Estacionárias Quirais do Tipo Celulose (CHIRALCEL OD®).....	54
3.4.3 Separação de enantiômeros em escala semi-preparativa.....	58
3.5 ELETROFORESE CAPILAR COM SELETORES QUIRAIS.....	62
3.5.1 Tipos de Separações Quirais	63
3.5.1.1 Método Indireto.....	63
3.5.1.2 Método Direto.....	63
3.5.2 Separação Quiral utilizando Ciclodextrinas.....	64
3.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS	68
3.6.1 Parâmetros de validação.....	69
3.6.1.1 Seletividade	70
3.6.1.2 Exatidão.....	71
3.6.1.3 Precisão	72
3.6.1.4 Limite de detecção	72
3.6.1.5 Limite de quantificação	73
3.6.1.6 Linearidade.....	73
3.6.1.7 Robustez.....	73

4. JUSTIFICATIVA.....	75
5. MATERIAIS E MÉTODOS	80
5.1. MATERIAIS.....	80
5.1.1. Fármacos padrão (matéria-prima).....	80
5.1.2. Amostra	80
5.1.3. Reagentes, soluções e solventes.....	80
5.1.4. Equipamentos.....	82
5.1.4.1 Cromatografia de Alta Eficiência.....	82
5.1.4.2 Eletroforese Capilar.....	83
5.1.5. Tipos de colunas quirais e capilares	84
5.1.6 Outros aparelhos.....	84
5.2 METODOLOGIA	85
5.2.1 Determinação do Espectro de Absorção do Fumarato de Bisoprolol	85
5.2.2 Separação Enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol em escala Semi-preparativa	86
5.2.2.1 Preparação das soluções padrão de Fumarato de Bisoprolol para otimização do sistema em escala analítica.....	86
5.2.2.2 Determinação das Condições Cromatográficas para separação enantiomérica em escala analítica	87
5.2.2.3 Transferência dos parâmetros cromatográficos da escala analítica para escala semi- preparativa	91

5.2.2.3.1	Preparação da Solução de Fumarato de Bisoprolol para Coleta de Frações	91
5.2.2.3.1	Otimização do Sistema Cromatográfico em Escala Analítica	92
5.2.2.4	Coleta das Frações dos Enantiômeros Puros de Bisoprolol	93
5.2.3	Separação Enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol em Escala Analítica.....	94
5.2.4	Separação Enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol por Eletroforese Capilar.....	95
5.2.5	Processo de Esterificação das frações coletadas de enantiômeros puros para obtenção de (R)-Bisoprolol e (S)-Bisoprolol.....	102
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	104
6.1	DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO FUMARATO DE BISOPROLOL	104
6.2	SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FUMARATO DE BISOPROLOL EM ESCALA SEMI-PREPARATIVA	105
6.2.1	Desenvolvimento e Otimização do Sistema Cromatográfico em Escala Analítica.....	105
6.2.2	Otimização do Sistema Cromatográfico em Escala Semi-Preparativa.	106
6.2.3	Determinação do Método Analítico para Separação Enantiomérica em Escala Analítica	108

6.3	SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FUMARATO DE BISOPROLOL POR ELETROFORESE CAPILAR.....	109
6.4	PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES COLETADAS DE ENANTIÔMEROS PUROS PARA OBTENÇÃO DE (R)-BISOPROLOL E (S)- BISOPROLOL	112
7.	CONCLUSÕES	115
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

RESUMO

A diferença na atividade terapêutica, farmacocinética e / ou farmacodinâmica entre os enantiômeros de fármacos quirais impulsionou a necessidade de estudar e desenvolver métodos para determinação exata e precisa da pureza enantiomérica dos produtos farmacêuticos. Inicialmente, os enantiômeros foram separados em escala analítica. As condições analíticas foram adaptadas para a escala semi-preparativa para a obtenção enantiômeros puros. Os enantiômeros do bisoprolol foram separados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Foi adotado o sistema direto de separação, fase normal, utilizando coluna Chiralcel OD (250 x 4,6 mm id). A fase móvel foi composta por hexano: etanol: dietilamina (80:20:0.2, v / v / v), vazão de 1mL/min e detecção em UV a 273 nm. A separação dos enantiômeros (R)-bisoprolol e (S)-bisoprolol foi obtida com sucesso em escala analítica e semi-preparativa. Considerando as características de uma separação quiral, podemos concluir que os resultados são eficazes, por ser uma separação rápida e seletiva.

Palavras-chave: Bisoprolol, enantiômeros, cromatografia líquida de alta eficiência, separação quiral.

SILVÉRIO, VA Separation, Preparation and use of pure enantiomers in stereospecific quality control of pharmaceutical products containing Bisoprolol

ABSTRAT

The difference in therapeutic activity, pharmacokinetics, and / or pharmacodynamics between enantiomers of chiral drugs has raised the need to study and develop methods for accurate and precise determination of enantiomeric purity of pharmaceutical products. Initially, the enantiomers were separation in analytical scale. The analytical conditions were scaled up to semi-preparative level to obtain pure enantiomers. The enantiomers of bisoprolol were separated with high-performance liquid chromatography. Direct separation system was adopted in normal phase mode using Chiralcel OD column (250 x 4.6 mm id). The mobile phase was composed of hexane:ethanol:diethylamine (80:20:0.2, v/v/v), flow rate of 1mL/min and UV detection was made at 273 nm. The separation of enantiomers, (R)-bisoprolol and (S)-bisoprolol was successfully obtained in analytical and semi-preparative scale. Considering the characteristics of a chiral separation, we can conclude that the results are effective, because it is a fast and selective separation.

Keywords: Bisoprolol, enantiomers, high-performance liquid chromatography, chiral separation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (1) Estrutura molecular da Talidomida; (2) Estrutura molecular da Glutetimida.....	29
Figura 2: Linha do tempo demonstrando os principais eventos ocorridos na história da Talidomida.....	30
Figura 3: Rota sintética da Talidomida	37
Figura 4: Principais Principais metabólitos <i>ex vivo</i>	38
Figura 5:Demonstração esquemática dos enantiômeros da talidomida	39
Figura 6:(A) Estrutura química de S-Bisoprolol; (B) Estrutura química de R-Bisoprolol	47
Figura 7: Estrutura molecular do Fumarato de Bisoprolol e nome químico	49
Figura 8: Estrutura tridimensional da Celulose.....	55
Figura 9: Estrutura química da FEQ tri- 3,5 metilcarbamato de Celulose, comercializada como Chiralcel OD, Chiralcel OD-R e Chiralcel OD-H	55
Figura 10: Demonstração das possíveis interações do Bisoprolol com a FEQ de Celulose.....	57
Figura 11: Estrutura molecular e dimensional das Ciclodextrinas.....	65

Figura 12: Vendas de medicamentos com único enantiômero (1992-2003) e projeções para 2008	76
Figura 13: Espectro de Absorção do Fumarato de Bisoprolol (16 µg/mL) em hexano: isopropanol:dietanolamina (80:20:0,4 v/v/v)	104
Figura 14: Cromatograma da Separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol em escala analítica; Condições: FEQ Chiralcel OD [®] (250 x 4,6 mm d.i); FM: Hexano: PrOH: DEA (90:10:0,4 v/v/v); Detecção: 273 nm; Vazão: 1,0 mL/min;Vol. Inj.: 40 µL;Temp.: 25 °	106
Figura 15: Cromatograma da Separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol utilizando a FEQ Chiralcel OD [®] (250 x 10 mm d.i); FM: Hexano: PrOH: DEA (92:8:0,4 v/v/v); Detecção: 273 nm; Vazão: 3,7 mL/min;Vol. Inj.: 350 µL;Temp.: 25 °C;.....	107
Figura 16: Cromatograma da Separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol em escala analítica; Condições: FEQ Chiralcel OD [®] (250 x 4,6 mm d.i); FM: Hexano: PrOH: DEA (80:20:0,4 v/v/v); Detecção: 273 nm; Vazão: 1,0 mL/min;Vol. Inj.: 30 µL;Temp.: 25 °	108
Figura 17: Eletroferograma da Separação parcial dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol; Condições: Capilar: sílica fundida de 40,2 cm de comprimento sendo 30 cm efetivos, 75 µm de d.i. e 375 µm de d.e., Beckman Coulter MDQ [®] ; Eletrólito: Fosfato de Sódio 75 mM, HPβCD 30 mM, pH 2,5; 20 k, detecção UV em 200 nm.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição enantiosseletiva e características do Bisoprolol	48
Tabela 2: Medicamentos comercializados no território nacional	49
Tabela 3: Medicamento comercializado no território nacional, conteúdo associações com Fumarato de Bisoprolol	49
Tabela 4: Relação de agentes de Derivação Quiral	51
Tabela 5: Separações enantioméricas do Bisoprolol através de CLAE encontrados na literatura.	61
Tabela 6: Separação enantiomérica do β -bloqueador Bisoprolol através de Eletroforese Capilar encontrados na literatura.	67
Tabela 7: Parâmetros necessários para validação conforme USP 33.	70
Tabela 8: Sistemas cromatográficos utilizando a coluna Chiralcel OD em escala analítica testados para determinação dos parâmetros ideais para aplicação na escala semi-preparativa.	89
Tabela 9: Relação de ensaios para otimização do sistema cromatográfico em Escala Semi-preparativa	92
Tabela 10: Relação de ensaios realizados visando a separação enantiomérica de (R-S)-Bisoprolol pela técnica de Eletroforese Capilar.	97

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A quiralidade dos compostos químicos, especialmente compostos terapêuticos, é um tema muito importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e de fiscalização no 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 ^(64,66).

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.

As técnicas cromatográficas empregando fases estacionárias quirais (FEQs) são de grande valor nas mencionadas áreas de estudos. A técnica permite identificação, quantificação e separação de 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.

Os últimos anos foram marcados pela implementação de outra importante técnica instrumental de separação, a eletroforese capilar (EC). Na EC, a utilização de solventes orgânicos é praticamente nulo. Além disso, a alta eficiência obtida em EC facilita a separação de enantiômeros, a qual é possível com fatores de separação tão baixo quanto $\alpha = 1,01$. Outras vantagens que fazem a EC se estabelecer como uma das principais técnicas utilizadas em separações quirais são a versatilidade e simplicidade instrumental, menores tempos de análise e baixo consumo de reagentes caros.

O crescimento rápido na comercialização de fármacos quirais no mercado despertou a necessidade do estudo de novos métodos de separação e quantificação enantiomérica destes fármacos para garantir a qualidade dos medicamentos. Para o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral (CLAE-FEQ) e eletroforese capilar com seletos quirais, há a necessidade dos enantiômeros opticamente puros para serem empregados como padrões. Estas substâncias podem ser obtidas por síntese assimétrica ou pela separação de uma mistura racêmica dos antípodas.

Freqüentemente, a síntese assimétrica parece ser relativamente menos prática, devido ao fato de que o desenvolvimento de uma rota da síntese é demorado e somente um dos enantiômeros pode ser obtido em cada rota, visto que a resolução de uma mistura racêmica forneceria ambos enantiômeros.

A disponibilidade restrita dos enantiômeros individuais dificulta o desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos, exatos e precisos. Este problema pode ser superado pela separação enantiomérica de misturas racêmicas com colunas semi-preparativas com posterior caracterização e purificação dos enantiômeros individuais ^(5,26,27,28,44,48).

O presente trabalho propôs o desenvolvimento de métodos cromatográficos para a separação e obtenção de enantiômeros puros do fármaco que faz parte de um grupo farmacológico importante, os β -bloqueadores. Assim, após a separação, pretende-se empregar os enantiômeros puros no desenvolvimento e na validação de métodos analíticos utilizando CLAE com colunas quirais e EC com seletos quiais, para a determinação quantitativa de enantiômeros, visando à aplicação no controle de qualidade de preparações farmacêuticas disponíveis no comercio brasileiro, sob a forma racêmica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- Empregar cromatografia líquida de alta eficiência com fase quiral em escala analítica para obter separação enantiomérica do bisoprolol;
- Otimização de sistema cromatográfico (parâmetros) como seletividade e resolução dos picos para que o método desenvolvido seja transposto em escala semi-preparativa empregando FEQ do tipo Chiralcel OD[®] com diâmetro interno de 1,0 cm;
- Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos para possibilitar alta capacidade de carregamento em escala semi-preparativa assim obter separação, com alto rendimento, dos enantiômeros puro;.
- Identificação e caracterização dos enantiômeros puros obtidos desta forma, empregando técnicas como espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear e polarimetria rotacional;
- Empregar os enantiômeros puros obtidos, desta forma, no desenvolvimento e validação dos métodos específicos para a separação enantiomérica fármaco, de modo a obter-se uma separação rápida, por métodos sensíveis, exatos e precisos;

- Utilizar os métodos validados na determinação enantiomérica quantitativa dos referidos fármacos em formulações farmacêuticas comerciais.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TALIDOMIDA: UMA TRAGÉDIA

Um fato que não pode ser esquecido, e que já está registrado na história da indústria farmacêutica é o desastre da comercialização da Talidomida em território mundial. Este medicamento comercializado no final da década de 50, início da década de 60, tornou-se um importante marco de incentivo a pesquisa clínica visando a comprovação da segurança e eficácia de novos medicamentos.

Na época, um estudo prévio mais aprofundado dos enantiômeros puros (R)-Talidomida e (S)-Talidomida poderia ter evidenciado a teratogenicidade do enantiômero (S)-Talidomida, o que reforça muito a importância do estudo e comprovação da segurança e eficácias de enantiômeros opticamente puros de medicamentos racêmicos.

3.1.1 Histórico

A Talidomida, [(±)2-(2,6-dioxo-3-piperidinil)-1*H*-isoindol- 1,3-(2*H*)-diona; ou (±)-ftalimidoglutarimida (1)], foi descoberta por série de fatores fortuitos e primeiramente relatada por Wilhelm Kunz, em 1953. Sua síntese foi realizada na indústria farmacêutica German Company Chemie Grünenthal, objetivando a preparação de pequenos peptídeos úteis na produção de novos antibióticos. Entretanto, durante a rota sintética proposta inicialmente, Wilhelm Kunz isolou um produto secundário, racêmico, não peptídico (1), que foi reconhecido pelo farmacologista da Chemie Grünenthal, Herbert Keller, como um análogo

estrutural da glutetimida (2). Posteriormente, o perfil sedativo-hipnótico da Talidomida (1) foi bem caracterizado ¹⁰⁶.

Figura 1: (1) Estrutura molecular da Talidomida; (2) Estrutura molecular da Glutetimida¹⁰⁶

A imprudência e as agilidades logísticas e comerciais da indústria farmacêutica, em sua era de ouro, movida pela ganância financeira pode ser facilmente visualizada na linha do tempo demonstrada na figura X:

Figura 2: Linha do tempo demonstrando os principais eventos ocorridos na história da Talidomida ^{106,107,108}.

Os experimentos realizados em ratos, cobaias e coelhos não demonstraram taxas de letalidade significativas, mesmo utilizando altas doses, levando a conclusão que a intoxicação aguda pela Talidomida seria um evento quase impossível. Como eficácia, seu potencial sedativo-hipnótico demonstravam resultados similares aos barbitúricos comercializados na época. Entretanto, não se realizou nenhum teste de teratogenicidade, somente de toxicidade, muito embora naquela época já fosse sabido que muitas substâncias químicas, incluindo as de baixa toxicidade aguda em adultos, poderiam causar danos fetais ¹⁰⁶.

Entre 1954 e 1957, inúmeros ensaios clínicos foram realizados com o objetivo de avaliar a eficácia da droga para uma ampla diversidade de situações, como distonia neurovegetativa, tuberculose, influenza, coqueluche, hipertensão, arteriosclerose, hipertireoidismo, afecções gástricas de origem

nervosa e problemas hepáticos. A empresa disseminava a idéia de que se tratava de uma droga multipotente e livre de efeitos colaterais.

Com estes “importantes” resultados em animais de laboratório, sendo estes generalizados e extrapolados para humanos, a indústria *Grunenthal* lançou o Contergan ®, nome/marca dada a substância Talidomida, no mercado em outubro de 1957, com indicação terapêutica de um sedativo e com a ampla divulgação dos baixos índices de toxicidade, utilizando o *slogan* de “inteiramente atóxico” e consumido sem prescrição médica ^{106,107}.

Uma bem elaborada campanha de marketing foi realizada, visando a ampla divulgação do novo fármaco para a população, mas sem perder o foco nos médicos e farmacêuticos. Entre as ações realizadas se destacam: a utilização do *slogan* “completamente inócuo, completamente seguro”, o envio de milhares de cartas explicativas para o meio médico, publicações de anúncios em veículos científicos e reconhecidos pelo meio médico.

O resultado desta campanha foi o consumo de noventa mil unidades por mês de Talidomida no primeiro ano de comercialização, o que o transformou em um dos medicamentos líderes de vendas na Alemanha ¹⁰⁸.

Associações medicamentosas com outros compostos também foram comercializadas pela *Grunenthal*. Esses produtos eram indicados para resfriados, tosse, cefaléias e asma. Uma das apresentações farmacêuticas

sob forma líquida era usualmente utilizada em hospitais alemães para sedar crianças durante exame eletroencefalográfico ¹⁰⁷.

O super aumento das vendas impactou no balanço financeiro da empresa, sendo que em 1960, foi o auge do processo de expansão do mercado, vendendo aproximadamente 14 toneladas do produto neste ano somente na Alemanha. Em nível mundial, cerca de vinte países foram licenciados para produzir e/ou distribuir a talidomida. Nessa ocasião, 14 empresas eram responsáveis pela produção do medicamento sob 17 diferentes nomes de marca, alcançando todos os continentes.

No mesmo ano, paralelamente ao crescimento das vendas, começaram a surgir os primeiros relatos médicos sobre reações adversas, incluindo constipação intestinal, tonteados, sensação de ressaca, perda de memória e polineurites, entre outras. Por seu lado, a *Grunenthal* minimizava esses relatos, atribuindo-os ao uso de altas doses e por tempo prolongado ¹⁰⁸.

Os mesmos resultados de vendas e financeiros foram alcançados pela *Distillers Biochemicals Ltd.* (DBCL), empresa de grande porte no mercado de bebidas alcoólicas na Grã-Bretanha, através da comercialização do Distival®, nome/marca conferida a Talidomida no local, em 1958. Essa empresa viu a talidomida como uma droga maravilhosa, que poderia transformar-se numa alternativa para o uísque: “se as pessoas iam engolir pílulas em lugar de *Johnny Walker*, a DBCL queria garantir sua participação nesse mercado” ¹⁰⁷.

A mesma sistemática de divulgação de marketing realizada pela *Grunenthal* foi adotada pela DCBL, focando os baixos índices de intoxicação e muitas indicações terapêuticas para um mesmo medicamento, utilizando como suporte técnico um relatório emitido pela *Grunenthal*, sem a realização de mais nenhuma avaliação.

Preocupada com os lucros, essa empresa ignorou os relatos médicos sobre possíveis efeitos colaterais relacionados ao uso prolongado do produto, dentre os quais ressaltava-se a neurite periférica. Dois meses antes do início da comercialização do medicamento na Inglaterra, foram publicados no *British Medical Journal* os resultados das pesquisas realizadas pela DCBL.

Ignorando essas recomendações, o departamento de vendas promoveu ampla campanha publicitária enfatizando a segurança do Distival®, de tal forma que um dos anúncios veiculados pela televisão apresentava uma criança pequena tentando alcançar um vidro do remédio em uma prateleira com medicamentos ¹⁰⁷.

Como era esperado, o resultado foi espetacular. Em 1961, a DCBL já tinha atingido o patamar de 64 milhões de pílulas de talidomida vendidas. Empenhada em ampliar mais ainda seu mercado, nesse mesmo ano enviou folheto aos médicos afirmando que: “O Distival® pode ser administrado com segurança para gestantes e mães no processo de aleitamento materno sem quaisquer efeitos adversos tanto para as mães como para os bebês...”¹⁰⁸.

3.1.1.1 Focomielia

A partir de 1959, inicialmente na Alemanha, começaram os relatos médicos sobre o aumento da incidência de nascimentos de crianças com um tipo peculiar de malformação congênita, caracterizada pelo desenvolvimento defeituoso dos ossos longos dos braços e pernas e cujas mãos e pés variavam entre o normal e o rudimentar. A essa síndrome foi dado o nome de Focomielia, pela semelhança daquelas crianças com a forma externa das focas ¹⁰⁷.

Em setembro de 1961, Wiedemann chamou a atenção para o aumento da incidência de malformações hipoplásticas ou aplásticas das extremidades, tendo levantado a hipótese de associação desses eventos com o uso de algum novo medicamento. Naquela ocasião, vivia-se a famosa era de ouro da indústria farmacêutica, que colocava anualmente no mercado uma enorme quantidade e variedade de novos produtos.

Em novembro de 1961, durante o *North Rhein-Westphalia Pediatric Meeting* em Dusseldorf, Alemanha, que Lenz, após a apresentação de 34 casos de recém-natos com graves deformidades das extremidades, em pesquisa realizada por Pfeiffer & Kosenow, levantou publicamente a possibilidade de as anomalias congênitas relatadas terem sido provocadas pelo consumo de talidomida durante a gestação ^{107, 108}.

Essa hipótese foi reforçada por estudos que estabeleceram a correlação entre o uso da talidomida em gestantes e o desenvolvimento das

referidas anormalidades congênitas, onde se observou que 20% das gestantes acompanhadas e que fizeram uso do Distival® como antiemético durante a gravidez, geraram crianças com múltiplas e graves anormalidades, enquanto a incidência geral de anormalidades congênitas observadas anteriormente em seu país era de cerca de 1,5% ¹⁰⁷.

Ainda no ano de 1961 a talidomida já não era mais comercializada na Alemanha e Inglaterra, e posteriormente em diversos outros países. Em agosto de 1962 já era possível observar um grande declínio no número de nascimentos com as malformações de membros. No entanto, milhares de crianças já haviam nascido em todo o mundo com tais anomalias, e o número estimado de vítimas em todo o mundo é em torno de dez a quinze mil crianças nascidas. O número de abortos em consequência do uso do fármaco não é conhecido ¹⁰⁸.

Nos Estados Unidos, onde a talidomida não chegou a ser licenciada em razão de exigências sobre segurança impostas por uma funcionária da agência regulatória americana, o *Food and Drug Administration* (FDA) saiu desse episódio fortalecido, passando a assumir a coordenação de todas as atividades relativas à política de regulação de medicamentos naquele país, a partir da emenda Kefauver-Harris de outubro de 1962 ¹⁰⁶.

3.1.1.2 No Brasil

A talidomida começou a ser comercializada no Brasil em março de 1958, tendo sido relatados os primeiros casos de malformações a partir de 1960. Apesar de ter sido retirada do mercado na Alemanha e Inglaterra no final de 1961, por total falta de informação quanto aos efeitos adversos já comprovados, o medicamento continuou sendo vendido em nosso país como uma droga “*isenta de efeitos colaterais*”, pelo menos até junho de 1962. Nesse período (1958-1962), a talidomida foi comercializada em território nacional por diversos laboratórios farmacêuticos, sob diversos nomes de marca ¹⁰⁷.

No período compreendido entre 1962 e 1965, a talidomida foi banida de quase todo o mundo. De acordo com informações obtidas junto à Associação Brasileira dos Portadores da Síndrome da Talidomida (ABPST), esse medicamento só foi de fato retirado do mercado brasileiro em 1965, ou seja, com pelo menos quatro anos de atraso. O número de vítimas ditas de primeira geração é estimado em cerca de trezentos. Os casos que ocorreram no período compreendido entre agosto de 1962 e 1965 devem ser considerados como casos evitáveis da síndrome ¹⁰⁷.

3.1.2 Síntese e Metabolismo

A metodologia sintética empregada na obtenção da (*R,S*)- talidomida (1) explorou, numa primeira etapa, a condensação do (*R,S*)-ácido glutâmico com anidrido ftálico (3), seguida da etapa chave da estratégia sintética, que consistiu na condensação do intermediário ftalimídico (4) com amônia em temperatura elevada (Figura 3).

Figura 3: Rota sintética da Talidomida

Estudos, *ex vivo*, sobre o destino metabólico da Talidomida permitiram evidenciar sua instabilidade em solução aquosa, em diferentes valores de pH. Em pH=6,0 observou-se a hidrólise espontânea do anel glutarimídico, originando os derivados *o*-(*orto*-carboxi-benzamido)glutarimida (5) e (6) como principais metabólitos (Figura 4)¹⁰⁶.

Entretanto, em pH fisiológico (pH=7,4) a talidomida sofre ca. 28% de metabolização na primeira hora de ensaio, sendo os principais metabólitos formados identificados como produtos de hidrólise do anel ftalimídico e glutarimídico, originando majoritariamente os compostos (7) e (8) (Figura 4). Por outro lado, em pH=8,0 sua taxa de metabolização é consideravelmente aumentada, ca 66% na primeira hora, evidenciando que o metabolismo *in vivo* da Talidomida é estritamente dependente do pH da biofase¹⁰⁶.

Figura 4: Principais metabólitos *ex vivo*.

3.1.3 Quiralidade

A constatação no início da década de 60 dos efeitos teratogênicos provocados pela (R,S)-Talidomida em gestantes, nos três primeiros meses de gravidez, representou um marco na conscientização do risco da administração de um fármaco em sua forma racêmica, quando a razão eudísmica entre os dois enantiômeros é desconhecida. Posterior tentativa de resolução cromatográfica da Talidomida e administração das espécies enantiomericamente puras, *i.e.*, (*R*) e (*S*)-Talidomida, demonstraram que o efeito teratogênico da talidomida era proveniente do emprego do enantiômero de configuração absoluta (*S*), enquanto seu antípoda era desprovido de ação teratogênica¹⁰⁶.

Figura 5: Demonstração esquemática dos enantiômeros da talidomida ⁽¹⁾

Todavia, a estereoespecificidade da ação teratogênica da Talidomida foi evidenciada como sendo dependente da espécie animal estudada. Por outro lado, a atividade da Talidomida como inibidor da produção de TNF- α foi identificada como sendo estereosseletiva, tendo-se o enantiômero de configuração absoluta (S) como eutômero¹⁰⁷.

Eriksson e colaboradores demonstraram a rápida epimerização da Talidomida em plasma humano, *in vivo*, após administração por via oral das espécies enantiomericamente puras. De fato, a inversão de configuração de fármacos enantiopuros ou racêmicos ocorre em outras classes terapêuticas como nos antiinflamatórios não-esteróides pertencentes à classe dos ácidos 2-aril-propionícos²⁰, sugerindo que o emprego da Talidomida em sua forma enantiomericamente pura não evitaria a tragédia teratogênica ocorrida no início da década de 60¹⁰⁶. Trabalhos relataram estudos comparativos sobre a

inversão de quiralidade e hidrólise de Talidomida em pacientes tratados, administração por via oral, com Talidomida . Os resultados obtidos a partir destes estudos denotam uma nítida diferença farmacocinética quanto aos processos de absorção e eliminação dos enantiômeros da Talidomida, e comparando-se os resultados obtidos *in vitro versus in vivo* sugere-se que o processo de epimerização seja dependente da concentração de albumina, predominando, portanto, no sangue ou em compartimentos extravasculares ricos neste tipo de proteína sérica¹⁰⁶.

3.1.4 Novas aplicações

Com base na descoberta das propriedades antiinflamatórias e imunorreguladoras da Talidomida, a indústria norte-americana Celgene Co. solicitou ao FDA sua aprovação para uso no tratamento da hanseníase, concedida em julho de 1998. Marcava-se de forma definitiva o renascimento deste fármaco, que representa, atualmente, um dos principais agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento efetivo dos lepromas^{106, 107, 108}.

Após adquirir o direito de comercializar e estudar a Talidomida, a Celgene Co. iniciou série de ensaios clínicos com este fármaco, visando ao tratamento de doenças auto-imunes relacionadas ao aumento da concentração plasmática de TNF- α , tais como artrite reumatóide e doença de Crohn. Trabalhos paralelos divulgados por vários laboratórios de pesquisa, demonstram a aplicação terapêutica potencial da talidomida no câncer, interferindo com o processo de angiogênese patológica, na AIDS, mais especificamente no retardamento da replicação do HIV, e no auxílio da perda

de peso desordenada de portadores do vírus da imunodeficiência adquirida e do bacilo da tuberculose ¹⁰⁶.

3.2. β -BLOQUEADORES

Os β -bloqueadores são agentes anti-hipertensivos bastante eficazes no controle da hipertensão arterial, angina pectoris, arritmias cardíacas e tratamento do infarto do miocárdio, mesmo quando usados em monoterapia. Exibem algumas diferenças entre si, quer nas reações adversas, quer em algumas indicações terapêuticas específicas, fato este que pode ser devido à diferente seletividade para os receptores, às características lipofílicas de alguns β -bloqueadores e à atividade simpatomimética intrínseca que vários deles possuem.

O início do desenvolvimento desta classe de medicamentos iniciou-se quando Ahlquist formulou a hipótese que os efeitos das catecolaminas eram mediados pela ativação de receptores α e β distintos. Esta hipótese impulsionou a síntese e avaliação farmacológica dos bloqueadores dos receptores β ⁽⁹⁷⁾.

Dicloroisoproterenol foi o primeiro agente seletivo desenvolvido, contudo, é um agonista parcial, o que impossibilitou o uso clínico de forma segura. Sir James Black e colaboradores iniciaram um programa no fim da

década de 1950, objetivando o desenvolvimento de outros agentes, surgindo inicialmente o pronetalol, contudo causando tumores no timo de camundongos, e em pouco tempo o propranolol ^(97, 104). O desenvolvimento do propranolol foi um marco histórico, e a partir deste, se desenvolveu uma gama de β -Bloqueadores ⁽¹⁰⁴⁾.

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 ^(43, 49, 73). Normalmente, a atividade β -bloqueadora cardíaca é devida ao isômero S, sendo que a razão de atividade entre os enantiômeros pode ser altamente variável. Os β -bloqueadores como carvedilol e labetalol têm também efeito bloqueador α , fato que condiciona a diminuição da resistência vascular periférica, sem a conseqüente taquicardia reflexa (bloqueio receptor beta). Em caso de ser necessária a associação de outro anti-hipertensivo a um β -bloqueador, deve preferir-se um diurético ou um vasodilatador direto. Alguns β -bloqueadores (ex: bisoprolol, carvedilol, nebivolol) podem ser utilizados, quando acompanhados por outras medidas terapêuticas (diuréticos), no tratamento da insuficiência cardíaca.

A maioria dos agentes β -bloqueadores freqüentemente prescritos são formulados e comercializados na forma racêmica ⁽²³⁾ embora, para alguns

deles, já tenha sido demonstrado que o enantiômero S é o responsável pelo efeito farmacológico principal e que a oxidação hepática é altamente estereoespecífica. Pelo menos um centro quiral é encontrado nas estruturas dos β -bloqueadores na porção α -hidroxietilamina (aminoálcool).

Os dados encontrados na literatura sobre a separação enantiomérica dos referidos β -bloqueadores envolvem etapas vagarosas de extração e processos de derivatização, o que se torna inadequado para separação e sua transposição para obtenção dos enantiômeros em escala semi-preparativa, além de não podem ser aplicados na quantificação de enantiômeros em medicamentos.

No Brasil, os agentes β -bloqueadores são comercializados em diversas formas farmacêuticas, tais como soluções injetáveis, soluções oftálmicas e comprimidos ⁽²⁰⁾. Os métodos cromatográficos semi-preparativos desenvolvidos e padronizados nesta pesquisa serão empregados para separação e purificação dos enantiômeros individuais destes fármacos e com posterior utilização na análise de amostras comerciais contendo β -bloqueadores, com o objetivo de avaliar-se a constituição e a pureza isomérica destes fármacos em medicamentos.

3.3 BISOPROLOL

O Bisoprolol é um antagonista dos receptores β , classificado como um β 1-Seletivo, de segunda geração⁽⁹⁷⁾. Desprovido da atividade simpaticomimética intrínseca ou estabilizadora da membrana.

3.3.1 Farmacocinética

Absorção: o Bisoprolol é quase completamente (>90%) absorvido a partir do trato gastrointestinal e, devido a sua pequena primeira passagem de metabolismo de cerca de 10%, ele possui uma biodisponibilidade absoluta de aproximadamente 90% após a administração oral.

Distribuição: o volume de distribuição é de 3.5L/kg. Possui baixa conectividade às proteínas plasmáticas (cerca de 30%).

Metabolismo: O Bisoprolol é metabolizado via caminhos oxidantes sem conjugação subsequente. Todos os metabólitos, sendo muito polares, são eliminados pelos rins. Os maiores metabólitos no plasma e na urina humanos foram descobertos como isentos de atividade farmacológica. Dados

in vitro de estudos em microsossomos de fígado humano mostram que o Bisoprolol é metabolizado primariamente via CYP3A4 (~95%) com CYP2D6 apenas desempenhando um papel menor.

Eliminação: A liberação do Bisoprolol é equilibrada entre a eliminação renal da molécula não alterada (~50%) e o metabolismo hepático (~50%) para metabólitos que são, também, excretados via renal. A liberação total do Bisoprolol é de aproximadamente 15 l/h. O Bisoprolol tem uma meia vida de eliminação de 10-12 horas.

A farmacocinética em pacientes com insuficiência cardíaca crônica estável e com funções renais ou hepáticas prejudicadas, não foi estudada. Em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (NYHA estágio III) os níveis de plasma do Bisoprolol são mais altos e a meia vida é prolongada se comparados a voluntários saudáveis.

3.3.2 Farmacodinâmica

O Bisoprolol, agente β -bloqueador provido de seletividade β_1 e destituído de ação simpatomimética intrínseca (ASI) e efeito de estabilização

de membrana. Somente apresenta afinidade muito baixa ao β_2 -receptor dos músculos lisos dos brônquios e vasos, assim como aos β_2 -receptores concernentes com a regulação metabólica. Assim sendo, não se espera, geralmente, que o Bisoprolol influencie a resistência das vias aéreas e os efeitos metabólicos mediados por β_2 . Sua seletividade β_1 estende-se além da faixa de dosagem terapêutica.

O Bisoprolol não possui efeito inotrópico negativo pronunciado. O Bisoprolol alcança seu efeito máximo 3-4 horas após administração oral. A meia vida de eliminação de plasma de 10-12 horas fornece 24 horas de eficácia após uma dosagem única diária. O efeito anti-hipertensivo máximo do Bisoprolol é, geralmente, alcançado após duas semanas.

Na administração aguda em pacientes com doença coronária sem insuficiência cardíaca crônica, o Bisoprolol reduz a frequência cardíaca e o volume de ejeção, reduzindo, assim, o débito cardíaco e o consumo de oxigênio. Na administração crônica a inicialmente elevada resistência periférica diminui. Entre outras, a depressão da atividade renina no plasma é debatida como um mecanismo da ação subjacente ao efeito anti-hipertensivo dos β -bloqueadores.

3.3.3 Enantiosseletividade do Bisoprolol

O Bisoprolol possui dois enantiômeros (Figura 6), e conforme relatado anteriormente, os enantiômeros podem apresentar atividades farmacológicas e farmacocinéticas diferentes.

Figura 6:(A) Estrutura química de S-Bisoprolol; (B) Estrutura química de R-Bisoprolol ⁽⁹⁸⁾

Estudos realizados comprovam a que os enantiômeros (R,S) Bisoprolol possuem enantiosseletividade nas propriedades farmacocinéticas. A seguir, a Tabela demonstra de forma sucinta as propriedades farmacológicas e a enantiosseletividade das propriedades farmacocinéticas.

Tabela 1: Descrição enantiosseletiva e características do Bisoprolol

Fármaco	Uso terapêutico	Comercializado	Farmacodinâmica	Farmacocinética	Propriedades	Referências
Bisoprolol	Hipertensão arterial, cardiopatias coronarianas, insuficiência cardíaca congestiva crônica, estável, de grau médio a grave, com função ventricular sistólica deprimida	Mistura racêmica	Receptores β Sem atividade simpatomimética intrínseca	- "Clearance renal": (R)-BP > (S)-BP	PM: 325,44 pKa: 9,16 Lipossolúvel	33,34
				- AUC: (S)-BP 1,5 vezes > (R)-BP		
				- Tempo de eliminação: (S)-BP 1,4 vezes > (R)-BP		
				- Biodisponibilidade: (S)-BP > (R)-BP		

3.3.3 Produto Comercial

O princípio ativo utilizados nas formas farmacêuticas é o Fumarato de Bisoprolol.

Fumarato de 1-[4-[(2-(1-metiletoxi)etoxi) metila]fenoxi-3-[(1-metiletil)amino]- 2-propanol

Figura 7: Estrutura molecular do Fumarato de Bisoprolol e nome químico

Seguem abaixo os fabricantes e os nomes comerciais:

Tabela 2: Medicamentos comercializados no território nacional

Fabricante	Nome Comercial	Formas Farmacêuticas
MERCK S/A	Concor	Comprimido Revestido (1,25 mg; 2,5 mg; 3,75 mg; 5mg; 7,5 mg; 10 mg)

Tabela 3: Medicamento comercializado no território nacional, conteúdo associações com Fumarato de Bisoprolol

Fabricante	Nome Comercial	Formas Farmacêuticas
		Comprimido Revestido
UNICHEM FARM. BRASIL LTDA	Prebloc - H	Fumarato de Bisoprolol : Hidroclorotiazida 2,5: 6,25 (mg/mg); 5: 6,25 (mg/mg); 10: 6,25 (mg/mg)

3.4 SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS QUIRAIS POR CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

3.4.1 Tipos de Separação Quiral

A separação cromatográfica de enantiômeros pode ser alcançada por vários métodos, todavia, é sempre necessário o uso de algum tipo de discriminador ou de seletor quiral ⁽⁸³⁾. Dois tipos diferentes de seletores podem ser descritos: o emprego de uma FEQ 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 líquida. 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.

3.4.1.1 Método Indireto

Os primeiros trabalhos de separação enantiomérica foram baseados em reações de racematos com uma substância enantiomérica pura, o agente de derivação quiral. Estas reações produzem duas ou mais diastereoisômeros, covalentemente ligados que devem diferir adequadamente na energia livre para a separação enantiomérica seja realizada. Os dois diastereoisômeros

resultantes podem ser consequentemente separados por CLAE convencional (70, 96).

O reagente de derivação quiral deve obedecer alguns critérios rigorosos como: pureza óptica, estabilidade em relação à isomerização durante o tempo de armazenamento e uso, reatividade idêntica e sensibilidade, pelo detector, para ambos os diastereoisômeros. A Tabela a seguir mostra alguns reagentes de derivação quiral.

Tabela 4: Relação de agentes de Derivação Quiral

Grupos Funcionais	Agentes de Derivação
Aminas Primárias e Secundárias	Ácidos Carboxílicos e sulfônicos e seus derivados, isocianatos e isotiocionatos
Alcoóis e fenóis	Os mesmos empregados para aminas e ácido D-(+)-glicurônico
Ácidos Carboxílicos	Alcoóis primários e secundários
Grupos carbonila	Bases de Schiff

Os métodos indiretos apresentam algumas desvantagens, são elas:

- O agente de derivação tem que ser de excelente qualidade, e alto grau de pureza;
- A contaminação enantiomérica dos reagentes podem levar à falsas determinações;
- Devido às diferentes propriedades químicas dos diastereoisômeros, as relações ou o valor da formação podem não ser os mesmos para cada enantiômero.^(70, 96)

3.4.1.2 Método Direto

O método direto pode ser realizado através da utilização de Fases Estacionárias Quirais (FEQ's) ou através da adição de aditivos quirais na fase móvel. Em ambos os casos, a separação ocorre através da formação de complexos diastereoisômeros transitórios.

Os aditivos quirais são substâncias enantiomericamente puras, adicionadas à fase móvel, que se ligam aos enantiômeros em análise, originando os diastereoisômeros transitórios que possuem propriedades físico-químicas diferentes, não sendo necessária a utilização de FEQ's. A ciclodextrinas e seus derivados são os aditivos mais amplamente utilizados^(70, 96).

Utilizando a FEQ, os complexos diastereoisoméricos transitórios são formados entre os enantiômeros e o material da fase quiral. A separação isomérica ocorre devido às diferenças de estabilidade dos complexos formados, diferenciando o tempo de retenção, desta forma, possibilitando a separação.

3.4.2 Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ)

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, 22, 54, 59, 60, 64, 70). A técnica tem sido amplamente aplicada na determinação da pureza óptica e da constituição isomérica de medicamentos, matérias-primas, preparações farmacêuticas e fluídos biológicos ^(1, 2, 3, 14, 15, 25, 26, 39, 53, 55, 62, 64, 73, 75, 78, 83, 85), estudos de instabilidade configuracional de fármacos (racemização, enantiomerização, epimerização) ^(23, 24, 25, 35) e determinação da farmacocinética e em estudos de metabolismo de fármacos ^(12, 21).

Atualmente, existem várias teorias sobre o mecanismo da separação envolvendo discriminação ou reconhecimento enantiomérico em FEQs. O

conceito mais aceito pelos pesquisadores da 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 FEQ 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 fornece os três pontos de interação requeridos. Outros pontos adicionais que proporcionam interações atrativas e/ou repulsivas, também contribuem para a enantiosseletividade ^(7, 19, 61, 62, 70).

3.4.2.1 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 de FEQs devido à falta de rigidez da estrutura ⁽²⁹⁾. Os trabalhos do grupo de OKAMOTO ^(37, 53, 54, 55) proporcionaram a obtenção de uma grande variedade de derivados de polissacarídeos, tais como: tris-benzoatos, tris-cinamatos e tris-(aril ou benzilcarbamatatos) adsorvidos em sílica gel.

As cadeias poliméricas de unidades D-(+) glucose contem ligações β -1,4 na celulose. Estas cadeias deitam se lado a lado formando uma estrutura linear⁽¹⁰⁵⁾.

Figura 8: Estrutura tridimensional da Celulose ⁽¹⁰⁵⁾

A FEQ utilizada neste trabalho foi a tri-3,5 metilcarbamato. Sua estrutura química está representada na figura 9:

Radical da Tri 3,5 metilcarbamato de Celulose
(Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, Chiralcel OD-R)

Figura 9: Estrutura química da FEQ tri- 3,5 metilcarbamato de Celulose, comercializada como Chiralcel OD, Chiralcel OD-R e Chiralcel OD-H ⁽¹⁰⁵⁾

O mecanismo de reconhecimento quiral em nível molecular das FEQs a base de polissacarídeos ainda não é esclarecida, contudo, alguns autores descreveram que a resolução quiral destas FEQs é alcançada através de interações π - π e dipolo-dipolo induzido dentro das cavidades quirais presentes nas FEQs. Átomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio e halogênicos nas FEQs são responsáveis pela formação de pontes de hidrogênio com os enantiômeros. As interações π - π ocorrem entre os anéis fenólicos das FEQs e os enantiômeros, no caso de racêmicos aromáticos. Durante a resolução quiral, os enantiômeros se encaixam de diferentes formas dentro das cavidades quirais presentes nas FEQs de polissacarídeos, sendo estabilizadas por vários tipos de ligações, de diferentes magnitudes. Algumas ligações fracas, como força Van der Waal e ligações iônicas também podem contribuir com a resolução quiral de FEQs de polissacarídeos ⁽¹⁰⁵⁾.

As possíveis interações entre os enantiômeros do Bisoprolol e uma FEQ de Celulose estão relatadas na figura a seguir.

Figura 10: Demonstração das possíveis interações do Bisoprolol com a FEQ de Celulose⁽⁹²⁾.

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:

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

- 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,
- Podem ser utilizadas para a separação enantiomérica de diversos tipos de compostos quirais,
- Colunas deste tipo, de diâmetro interno maior (1 cm) disponíveis no comércio, são rapidamente equilibradas e permitem separações e obtenção dos enantiômeros puros (vários mg) em pequeno espaço de tempo.

3.4.3 Separação de enantiômeros em escala semi-preparativa

A presença do centro quiral nos compostos terapeuticamente ativos é um fator importante na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Na atualidade, é indispensável à preparação / produção dos enantiômeros individuais para estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e desenvolvimento de métodos analíticos. Assim, a caracterização terapêutica, avaliações farmacológicas, toxicológicas e metabólicas são realizadas para cada um dos enantiômeros, separadamente. Essas informações, na maioria

das vezes, indicam os métodos e procedimentos para o desenvolvimento da forma farmacêutica correta.

Existem empresas e entidades governamentais e privadas que comercializam os isômeros puros, mas em muitos casos, apenas um dos enantiômeros é disponibilizado e em outros, nenhum deles. No entanto, é de extrema importância a disponibilidade de ambos enantiômeros puros para o desenvolvimento de métodos analíticos validados que sejam rápidos, precisos e exatos, com posterior aplicação na quantificação dos enantiômeros em formulações farmacêuticas e amostras biológicas.

Os enantiômeros puros podem ser preparados por síntese assimétrica ou pela resolução dos racematos. Embora a síntese assimétrica seja favorável quando a produção é em escala maior, o tempo necessário para desenvolvimento de um método de síntese é pouco vantajoso na fase inicial do desenvolvimento de um fármaco, quando são requeridas pequenas quantidades do enantiômero individual para a realização dos ensaios clínicos e o desenvolvimento e validação dos métodos cromatográficos. A outra desvantagem é que a síntese assimétrica produz somente um dos enantiômeros.

No entanto, empregando-se CLAE-FEQ com colunas semi-preparativas, podem ser obtidos os enantiômeros puros necessários para o

desenvolvimento de métodos analíticos. A CLAE-FEQ em escala fase semi-preparativa é uma resposta rápida e útil na preparação de enantiômeros puros. A referida técnica foi aplicada, com sucesso, na obtenção dos enantiômeros altamente puros e se tornou uma ferramenta eficiente na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico e no controle enantiomérico de qualidade farmacêutica.

Nas ultimas duas décadas, muitas colunas quirais tem sido disponibilizadas para serem empregadas em modo analítico, semi-preparativo e preparativo ^(15, 18). Entre os quatro tipos de seletores quirais (tipo I, II, III e IV) mais usados na atualidade, para separação enantiomérica de compostos quirais em escala preparativa, a FEQ do tipo Chiralcel OD[®], apresenta alta capacidade de carregamento e excelente enantiosseletividade, quando operada no modo fase normal. A coluna é capaz de separar enantiômeros de compostos derivados de ariletanolaminas e de ariloxipropanolaminas proposto neste projeto de pesquisa. A importância do crescimento de separações enantioméricas em escala preparativa e semi-preparativa foi revisada e discutida por Francotte ^(26, 27) e por Miller ⁽⁴⁴⁾.

Tabela 5: Separações enantioméricas do Bisoprolol através de CLAE encontrados na literatura.

Tipo	Coluna	Fase móvel	Amostra	Referencia
Separação direta	Chirobiotic T [®] (250×4,6 mm, 10 µm)	Metanol:Ácido Acético glacial:Trietilamina (100:0.02:0,025, v/v/v)	Plasma	46
Separação direta	Chiralcel OD [®] (250 x 4,6mm , 10 µm)	Hexano:2-propanol (10:0,9, v/v) + 0,01% Dietilamina	Urina e plasma	80
Separação direta	(<i>R</i>)-naftilglicina and 3,5-ácido dinitrobenzoico, ligado covalentemente. (250×4,6 mm, 10 µm)	Hexano:dicloroethano:Met anol (60:30:10, v/v/v).	Forma Farmacêuticas	91
Separação direta	Chirobiotic T [®] (250×4,6 mm, 10 µm)	Metanol:Ácido acético glacial:Trietilamina (100:0,020:0,025, v/v/v)	Forma Farmacêutica	52

3.5 ELETROFORESE CAPILAR COM SELETORES QUIRAIS

O primeiro método de separação enantiomérica foi através da Cromatografia Gasosa, que abrangia os compostos voláteis, termoestáveis e compostos que poderiam ser derivatizados sem racemização. Contudo, houve uma grande necessidade do desenvolvimento de técnicas analíticas utilizando fases líquidas. O desenvolvimento foi impulsionado pelo esclarecimento da enantiosseletividade de compostos biologicamente ativos⁽⁹⁵⁾.

No final da década de 1960, início da década de 1970, foi realizada a separação quiral utilizando a técnica de CLAE.

Em 1985, a Eletroforese Capilar (EC) surgiu, tornando uma técnica competitiva para separação enantiomérica, desde então esta década tem sido extensivamente desenvolvida⁽⁹⁵⁾.

A CE também pode ser aplicada na separação de compostos quirais de interesse terapêutico. Em geral, a maioria das separações tem sido efetuada por eletroforese capilar em solução livre (FSCE), utilizando seletores quirais como as ciclodextrinas. Outra forma comumente empregada para obtenção de resoluções quirais é a cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC) através da utilização de sistemas micelares estereoespecíficos ou ainda um sistema misto (micela-ciclodextrina).

3.5.1 Tipos de Separações Quirais

A separação de compostos quirais por CE pode ser efetuada através de método indireto ou direto.

3.5.1.1 Método Indireto

No método indireto o seletor quiral reage com a mistura racêmica antes da análise eletroforética produzindo dois diastereoisômeros estáveis, que podem então ser separados através de um sistema eletroforético não quiral. Este método é pouco utilizado por apresentar algumas desvantagens como: tempo de análise muito alto, emprego de seletores quirais com elevado grau de pureza, os enantiômeros devem conter grupos reativos e devem reagir na mesma proporção com o seletor quiral.

3.5.1.2 Método Direto

No método direto, o seletor quiral é adicionado ao eletrólito. A interação entre o seletor quiral e os enantiômeros ocorre durante o processo eletroforético, através da formação de complexos diastereoisoméricos lábeis. Estes complexos resultam da formação de ligações fracas como: ligações de hidrogênio, interações do tipo p-p, hidrofóbicas, eletrostáticas e tipo íon dipolo. O tipo e o número de interações formadas no complexo diastereoisomérico

determina tempo de migração diferenciado, possibilitando assim, a separação enantiomérica.

Os mecanismos envolvidos na separação direta compreendem a complexação por inclusão (ciclodextrinas e éter coroa), a interação por afinidade (proteínas, polissacarídeos e antibióticos) e os sistemas micelares estereoseletivos (sais biliares, tensoativos sintéticos).

3.5.2 Separação Quiral utilizando Ciclodextrinas

Na FSCE, reagentes quirais opticamente ativos são adicionados ao eletrólito a fim de possibilitar interações enantiosseletivas com as moléculas do soluto. A forma mais comum de separação quiral para resolução de compostos de caráter básico é freqüentemente realizada em pH ácido utilizando-se ciclodextrinas. O reconhecimento enantiosseletivo é normalmente explicado pelas interações entre as ciclodextrinas, que possuem diversos centros quirais, e o enantiômero incorporado.

Figura 11: Estrutura molecular e dimensional das Ciclodextrinas ⁽⁹⁵⁾

Através da derivação dos grupos hidroxilas, presentes na superfície das ciclodextrinas, a solubilidade e propriedades enantiosseletivas podem ser significativamente alteradas. A hidroxipropilciclodextrina e a dimetilciclodextrina são exemplos de ciclodextrinas derivatizadas que apresentam este comportamento. Além disso, as ciclodextrinas que possuem grupos ácidos e básicos ionizáveis são apropriadas para a separação de solutos não carregados.

A base para a separação é a interação estereoespecífica dos enantiômeros com a cavidade e a superfície da ciclodextrina. Em valores de pH baixo, o fluxo eletrosmótico é mínimo e as ciclodextrinas não migram.

Compostos básicos são protonados neste pH e migram em direção ao detector em virtude de sua carga. Quando o soluto interage com a ciclodextrina, sua mobilidade é bastante reduzida. Se dois enantiômeros possuírem constantes de estabilidade diferentes, um deles migrará mais lentamente do que o outro e as resoluções serão obtidos.

A FSCE com ciclodextrinas também pode ser executada na região de pH básico. Nestas condições, ocorre a separação por mecanismo diferente. A solução ácida é negativamente carregada e oposta ao fluxo eletrosmótico. Este fluxo elevado orienta a ciclodextrina neutra para o detector. O soluto aniônico, interagindo com a ciclodextrina neutra que está migrando, tem sua velocidade reduzida. Em consequência, o enantiômero que possui maior interação migra mais rapidamente do que seu antipoda.

As separações quirais também podem ser obtidas utilizando-se um tensoativo quiral ou adicionando-se um seletor quiral, como por exemplo, ciclodextrinas, ao eletrólito micelar. A princípio, acredita-se que as ciclodextrinas solubilizam-se nas micelas de dodecilsulfato de sódio (SDS) alinhando-se.

Tabela 6: Separação enantiomérica do β -bloqueador Bisoprolol através de Eletroforese Capilar encontrados na literatura.

Fármaco	Capilar*	Tampão	Seletor quiral	Amostra	Referência
Bisoprolol	26 cm x 50 μ m	50mM Tampão fosfato, pH 2,5	S- β - Ciclodextrina	Forma Farmacêutica	30

* Comprimento x diâmetro interno

3.6 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A ANVISA, através da RDC 17/2010, define validação como “ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema, realmente conduza aos resultados esperados”

(94).

A validação de métodos assegura sua credibilidade durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (102).

A validação de um método proposto é baseada em condições de preparo, tratamento de amostras e instrumentação bem definidas e documentadas, com o objetivo de extração de informações qualitativas e/ou quantitativas com um nível de incerteza aceitável (93).

A definição das condições de análise, geralmente, são baseadas em testes preliminares e algumas considerações como propriedades químicas, concentração dos analíticos e amostra, velocidade, custo da análise, etc. (93).

3.6.1 Parâmetros de validação

A literatura possui um amplo número de guias para avaliação de desempenho de métodos analíticos, apresentando diferentes terminologias e formas de expressar resultados. Apesar destas variações, todas levam a um mesmo propósito ⁽¹⁰¹⁾.

Cada método analítico possui suas variações e determinantes, principalmente devido às diferentes necessidades de cada caso. Por esses motivos, no *General Chapter* <1225>, a USP (2010) dividiu em quatro categorias os parâmetros, (Tabela 1), necessários para os diferentes propósitos da validação, onde:

Categoria 1: Procedimento para quantificação de fármacos, excipientes ou ingredientes ativos (incluindo conservantes) em produtos farmacêuticos;

Categoria 2: Procedimento para determinação de impurezas, incluindo os ensaios quantitativos e testes limite;

Categoria 3: Procedimentos analíticos para determinação de desempenho de ensaios como, dissolução, desintegração, etc.;

Categoria 4: Testes de identificação.

Tabela 7: Parâmetros necessários para validação conforme USP 33.

Parâmetros de desempenho analítico	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativa	Ensaio Limite		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Curva analítica	Sim	Sim	*	*	Não

* Pode ser requerido, depende da natureza do teste de especificidade

3.6.1.1 Seletividade

De acordo com o guia de validação do ICH (2005), especificidade é o teste realizado com o placebo para a avaliação da presença de analito, impurezas, produtos de degradação, etc. presentes na matriz da amostra, que

possam interferir no resultado final do analito em questão, garantindo que a resposta seja, exclusivamente, a do composto de interesse ⁽⁹⁹⁾.

Há diversos procedimentos para a determinação da seletividade. Uma das formas é comparando-se a matriz isenta da substância de interesse (placebo), com a matriz adicionada de padrão de interesse, sendo que, neste caso não deve apresentar interferentes eluindo no mesmo tempo que o analito, bem como deve-se apresentar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Outra maneira de identificar e determinar os compostos é submeter a amostra a condições de estresse utilizando variação de temperatura e meios ácido e alcalino, avaliando-se os produtos de degradação que possam interferir no resultado final ⁽¹⁰⁰⁾.

3.6.1.2 Exatidão

Exatidão é a medida que representa o grau de concordância entre a determinação de um analito (valor real ou encontrado) e seu padrão (valor verdadeiro) ⁽¹⁰¹⁾.

A forma de sua medida varia de acordo com o ensaio realizado. Os mais utilizados são: materiais de referência, comparação de métodos adição de padrão e testes de recuperação ⁽¹⁰⁰⁾.

3.6.1.3 Precisão

A precisão de um método analítico indica a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra ou padrões, sob condições definidas. Esse parâmetro é expresso através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), ambos em percentagem (%) ⁽⁹⁹⁾.

Para a determinação da precisão os guias de validação recomendam três ensaios distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade é avaliada através dos resultados obtidos em determinações de um analito sob as mesmas condições experimentais e operacionais em um curto intervalo de tempo. Na precisão intermediária, sob as mesmas condições, o analito é analisado quanto as variações de dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade avalia a diferença entre resultados de diferentes laboratórios ⁽¹⁰²⁾.

3.6.1.4 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor concentração do analito numa amostra que pode ser detectado, e não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais definidas ⁽¹⁰²⁾.

3.6.1.5 Limite de quantificação

Limite de quantificação é a menor concentração de um analito que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão, sob condições experimentais definidas. Geralmente, esse teste é utilizado para determinação de impurezas ou produtos de degradação em uma matriz ^(102, 101).

3.6.1.6 Linearidade

É o parâmetro analítico que avalia a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito ⁽¹⁰²⁾.

3.6.1.7 Robustez

Robustez é o ensaio que mede a sensibilidade do método frente a variações das condições de análise definidas. Portanto, diz-se que um método é robusto quando o resultado final não é afetado por pequenas e deliberadas modificações em seus parâmetros ⁽¹⁰²⁾.

JUSTIFICATIVA

4. JUSTIFICATIVA

Em anos recentes o impacto da quiralidade no planejamento, desenvolvimento e na utilização dos fármacos tem sido amplamente discutido. Medicamentos contendo fármacos como enantiômeros puros estão marcando presença significativa e crescente no mercado da indústria farmacêutica. Os fármacos racêmicos podem causar problemas devido às diferenças nos efeitos biológicos e nos perfis farmacocinéticos dos enantiômeros. Atualmente quase 50% dos 500 fármacos mais vendidos no mercado mundial são constituídos por moléculas quirais. Os fármacos comercializados como enantiômeros puros alcançaram uma marca de aproximadamente 170 bilhões de dólar em 2003. Desta quantidade, dois terços foram atribuídos às moléculas pequenas e somente um terço, aos biofármacos.

Os fármacos em forma enantiomericamente pura estão sendo utilizadas no tratamento de diversos tipos de doenças inclusive a ansiedade, depressão, indigestão, câncer, artrite, AIDS, alergias e doenças cardiovasculares. Basicamente as tecnologias usadas na produção desses fármacos quirais são: tecnologia tradicional (separações cromatográficas em escala preparativa), biocatálise e métodos de síntese assimétricas. Estimativas recentes apontam que em 2002 as vendas totais alcançaram os US\$ 7,0 bilhões a nível mundial, sendo deste total 55% gerados por tecnologia

tradicional, 35% por métodos assimétricos químicos e 10% por biocatálise. Em 2003 o panorama não mudou muito, do total (US\$ 7,7 bilhões), 54% foi produzido pela tecnologia tradicional, 35% por métodos assimétricos químicos e 11% por biocatálise.

Figura 12: Vendas de medicamentos com único enantiômero (1992-2003) e projeções para 2008 (63)

Em consequência, houve grande interesse no estudo e na pesquisa para separações quirais, isto é, na validação de métodos que podem separar e/ou caracterizar enantiômeros individuais. Entre estes métodos, a CLAE e a

EC teve papel fundamental. Quando um analista enfrenta a tarefa de desenvolver um método de separação quiral é importante que estejam disponíveis quantidades suficientes de enantiômeros individuais opticamente puros, de modo que os métodos por CLAE e EC possam ser desenvolvidos e validados.

Um dos principais problemas na CLAE-FEQ está relacionado com a disponibilidade e custos elevados dos enantiômeros opticamente puros. Este problema poderá ser superado empregando-se colunas quirais semi-preparativas para obter quantidades razoáveis, da ordem de mg, de cada enantiômero de fármaco quiral selecionado. A necessidade crescente para a obtenção rápida de enantiômeros puros para, por exemplo, avaliar o perfil farmacológico e realizar a determinação quantitativa de enantiômeros em formulações farmacêuticas, impulsionou o desenvolvimento rápido de equipamentos e de colunas quirais em escala preparativa e semi-preparativa. Este fato pode ser acompanhado pelo número crescente das publicações sobre o assunto ^(5, 15, 18, 26, 27, 28, 44, 48).

Poucos métodos validados foram encontrados para a separação e a determinação enantiomérica dos referidos β -bloqueadores (Tabela 3 e 4). Os β -bloqueadores propostos para estudo neste projeto são fármacos

relativamente novos e os enantiômeros individuais merecem maior atenção do ponto de vista analítica.

Levando-se em consideração esses fatos e visto que existe tendência de comercialização dos fármacos na forma isomericamente pura, está proposto neste projeto, o desenvolvimento e domínio de metodologia para obtenção dos enantiômeros puros. Após caracterização dos enantiômeros obtidos serão utilizados como padrões para desenvolver e validar métodos por CLAE-FEQ e EC, com posterior aplicação na análise de medicamentos contendo substâncias ativas racêmicas e/ou os enantiômeros puros.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. MATERIAIS

5.1.1. Fármacos padrão (matéria-prima)

- (R, S) – Bisoprolol; United States Pharmacopeia

5.1.2. Amostra

Foram utilizados comprimidos contendo 10 mg de Fumarato de Bisoprolol racêmico como amostra.

5.1.3. Reagentes, soluções e solventes

- Hexano, grau cromatográfico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Etanol, grau cromatográfico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;

- Isopropanol, grau cromatográfico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Metanol, grau cromatográfico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Dietilamina, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Trietilamina, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Ácido acético glacial, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Ácido trifluoroacético, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Citrato de sódio, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Ácido cítrico, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Acetato de amônio, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Acetato de sódio, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- Tetraborato de sódio, grau analítico Merck[®], Darmstadt, Alemanha;
- β -ciclodextrina hidratada, Sigma-Aldrich Co. ,St Louis, MO, Estados Unidos;

- β -ciclodextrina sulfatada (sal sódica), Sigma-Aldrich Co. ,St Louis, MO, Estados Unidos;
- (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina, Sigma-Aldrich Co. ,St Louis, MO, Estados Unidos;

5.1.4. Equipamentos

5.1.4.1 Cromatografia de Alta Eficiência

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência empregado 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 50 μ L e / ou 350 μ L modelo SIL-10 AD vp (Shimadzu Corporation, Japão);

- Sistema de bombeamento de solvente modelo LC-10Advp (Shimadzu Corporation, Japão);
- Sistema de desgaseificação “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).

5.1.4.2 Eletroforese Capilar

O sistema de eletroforese capilar empregado é composto por:

- Aparelho de eletroforese capilar (Beckman Coulter MDQ, Estados Unidos);
- Detector de arranjo de diodo UV-VIS e termostatização de amostras (Part. 289400 – Beckman Coulter, Estados Unidos);
- Detector de fluorescência induzida por Lazer (Part. 149898 – Beckman Coulter, Estados Unidos).

5.1.5. Tipos de colunas quirais e capilares

- 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);
- Chiralcel OD[®] (250 x 10 mm d.i) carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil em partículas de sílica de 10µm (Daicel Chemical Industries, Ltd. Japão);
- 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.);
- Capilar para eletroforese de sílica fundida com as dimensões 75 µm, com comprimento de 40 cm até detector.

5.1.6 Outros aparelhos

- Aparelho de ultra-som, Conecct, NFC, Brasil;
- Balança analítica com precisão de quatro casas, Mettler Toledo, AB204, Brasil;

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Determinação do Espectro de Absorção do Fumarato de Bisoprolol

Foram pesados analiticamente 10,0 mg de Fumarato de Bisoprolol e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 40 mL de etanol e procedeu-se a agitação em banho de ultra-som por 5 minutos. O volume foi completado com etanol, obtendo-se uma solução de 0,2 mg de Fumarato de Bisoprolol/mL. Dessa solução, foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para um balão volumétrico de 25 mL. O volume do balão foi completado com hexano:isopropanol:dietanolamina (80:20:0,4 v/v/v), obtendo-se uma solução de 16,0 µg de Fumarato de Bisoprolol/mL.

A solução final de 16,0 µg de Fumarato de Bisoprolol/mL foi utilizada para traçar o espectro de absorção no intervalo de comprimento de onda entre 350 e 190 nm.

5.2.2 Separação Enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol em escala Semi-preparativa

A otimização das condições para as separações enantioméricas do Fumarato de Bisoprolol, em escala semi-preparativa, foi efetuada através da CLAE utilizando FEQ do tipo Chiralcel OD[®] (250 x 4,6 mm d.i). Com base nos perfis de separações obtidos na coluna analítica, foi escolhido o sistema cromatográfico para a separação dos enantiômeros empregando FEQ do tipo Chiralcel OD[®] (250 x 10 mm d.i) em escala maior (semi-preparativa). As frações contendo os isômeros individuais foram coletadas em frascos separados.

5.2.2.1 Preparação das soluções padrão de Fumarato de Bisoprolol para otimização do sistema em escala analítica

Foi pesado analiticamente 10 mg do padrão Fumarato de Bisoprolol e transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Foi adicionado aproximadamente 8 mL de etanol no balão volumétrico e procedeu-se a

agitação de 5 minutos em banho de ultra-som. O volume foi completado com etanol até o menisco.

Foi pesado analiticamente 200 mg do padrão Fumarato de Bisoprolol e transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Foi adicionado aproximadamente 8 mL de etanol no balão volumétrico e procedeu-se a agitação de 5 minutos em banho de ultra-som. O volume foi completado com etanol até o menisco.

5.2.2.2 Determinação das Condições Cromatográficas para separação enantiomérica em escala analítica

Visando a determinação das condições cromatográficas ideais, as amostras foram cromatografadas utilizando a coluna Chiralcel OD[®] (250 x 4,6 mm d.i), em temperatura ambiente, detecção de 273nm, com diferentes volumes de injeção e diferentes fluxos de vazão.

Empregaram-se fases móveis apolares, diferentes misturas de hexano, etanol, isopropanol, dietanolamina e ácido acético glacial, para a separação de enantiômeros. Visando a separação semi-preparativa para coleta de frações, a cromatografia em fase normal oferece vantagens em relação à cromatografia em fase reversa. Além disso, dá maior segurança em relação à

estabilidade do seletor ligado à fase estacionária dentro da coluna. Assim, a recuperação e posterior purificação dos enantiômeros colhidos foram mais rápidas e eficientes.

Tabela 8: Sistemas cromatográficos utilizando a coluna Chiralcel OD em escala analítica testados para determinação dos parâmetros ideais para aplicação na escala semi-preparativa.

Ensaio	FASE MÓVEL					Vol. Injeção (μL)	Vazão (mL/min)	Concentração mg/mL
	Hexano	Etanol	Isopropanol	Dietanolamina	Ác. Acético			
1	75	25	---	---	---	20	1	1
2	75	25	---	---	---	10	1	1
3	80	20	---	---	---	20	1	1
4	95	5	---	---	---	20	1	1
5	99	1	---	---	---	20	1	1
6	90	10	---	---	---	20	1	1
7	80	---	20	---	---	20	1	1
8	80	---	20	---	---	10	1	1
9	80	---	20	---	---	5	1	1

10	80	---	20	0,2	---	20	1	1
11	80	---	20	0,4	---	30	1	1
12	80	---	20	0,4	---	30	0,9	1
13	80	---	20	0,1	0,1	20	0,8	1
14	80	---	20	0,1	0,1	20	1	1
15	85	---	15	0,2	---	20	1	1
16	85	---	15	0,4	---	30	1	1
17	90	---	10	---	---	5	1	1
18	90	---	10	0,2	---	20	1	1
19	90	---	10	0,2	---	30	1	1
20	90	---	10	0,4	---	30	1	1
21	90	---	10	0,4	---	40	1	20

5.2.2.3 Transferência dos parâmetros cromatográficos da escala analítica para escala semi-preparativa

5.2.2.3.1 Preparação da Solução de Fumarato de Bisoprolol para Coleta de Frações

Foram adequadamente triturados em um cadinho de porcelana 140 comprimidos contendo 10 mg de Fumarato Bisoprolol cada. O pó obtido foi transferido para um béquer de 150 mL. Adicionou-se aproximadamente 100 mL de etanol ao béquer, a mistura foi agitada manualmente com auxílio de um bastão de vidro e em seguida agitou-se por 10 minutos em banho de ultrassom. O líquido sobrenadante foi removido do béquer e transferido para um erlenmeyer de 250 mL. Este procedimento foi repetido mais duas vezes.

O sobrenadante da mistura foi filtrado através de uma membrana Millipore®, não estéril, 0,45 µm de tamanho de poro e 13 mm de diâmetro. Em seguida foi evaporado através de fluxo de nitrogênio até um volume aproximado de 20 mL. Em seguida esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado com etanol. Através deste procedimento estimou-se uma concentração de 28 mg de Fumarato de Bisoprolol/mL.

5.2.2.3.1 Otimização do Sistema Cromatográfico em Escala Analítica

O sistema cromatográfico adotado para ser transferido da escala analítica para a escala semi-preparativa foi o sistema número 21. Com base nestes valores, foram realizados alguns ensaios para ajuste finos , para então dar início as coletas das frações.

Tabela 9: Relação de ensaios para otimização do sistema cromatográfico em Escala Semi-preparativa

Ensaio	FASE MÓVEL			VI. Injeção	Vazão
	Hexano	PrOH	DEA		
1	90	10	0,4	300	4
2	90	10	0,4	300	3,5
3	95	10	0,4	300	4
4	93	7	0,4	300	4,3
5	92	8	0,4	300	4
6	93,5	6,5	0,4	350	3,7
7	92	8	0,4	350	3,7

5.2.2.4 Coleta das Frações dos Enantiômeros Puros de Bisoprolol

As condições cromatográficas utilizadas para as coletas das frações de enantiômeros puros foram as seguintes:

- Fase Estacionária Quiral: Chiralcel OD[®] (250 x 10 mm d.i);
- Fase Móvel: Hexano: Isopropanol: Dietanolamina (92:8:0,4 v/v/v);
- Detecção: 273 nm;
- Vazão: 3,7 mL/minuto;
- Volume de Injeção: 350 µL;
- Temperatura: 25 °C;

A fase móvel foi filtrada através de uma membrana filtrante Milliore hidrofóbica com 0.45µm de tamanho de poro, em seguida, desgaseificada em banho de ultrassom durante 20 minutos.

O sistema foi estabilizado durante 1 hora antes de iniciar as injeções e a coleta dos enantiômeros puros. As frações foram coletadas em frascos distintos, através da visualização dos picos nos cromatogramas, conforme os picos eluíam, as frações eram coletadas.

5.2.3 Separação Enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol em Escala Analítica

Foi utilizado o estudo de condições cromatográficas no item 5.2.2.2 deste trabalho para determinar o método de separação enantiomérica (R,S) Bisoprolol.

As condições cromatográficas utilizadas para determinação do método de separação enantiomérica em escala analítica utilizadas foram as seguintes:

- Fase Estacionária Quiral: Chiralcel OD[®] (250 x 4,6 mm d.i);
- Fase Móvel: Hexano: Isopropanol: Dietanolamina (80: 20: 0,4 v/v/v);
- Detecção: 273 nm;
- Vazão: 1,0 mL/minuto;
- Volume de Injeção: 20 µL;
- Temperatura: 25 °C;

Este método demonstrou ser rápido e possui uma boa resolução. O próximo passo deste trabalho é realizar a validação deste método.

5.2.4 Separação Enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol por Eletroforese Capilar

Diversos ensaios foram realizados visando encontrar condições eletroforéticas ideais para a separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol.

Com base na literatura, inicialmente foram avaliados os tampões que iriam compor o eletrólito em diferentes concentrações. Foram testados: Tetraborato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio.

Determinado o tampão, foram iniciadas as avaliações das ciclodextrinas em diferentes concentrações e condições eletroforéticas.

Ciclodextrinas avaliadas: β -ciclodextrina hidratada, β -ciclodextrina sulfatada (sal sódica), (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina, com a intenção de obter seletividade e resolução adequada entre os enantiômeros. As diferentes condições avaliadas foram em função da variação dos seguintes parâmetros: concentração do fármaco, concentração da ciclodextrina, introdução hidrodinâmica (pressão e tempo), voltagem e alteração do pH do eletrólito.

Outro ponto estudado foi o comportamento do pico frente à utilização de solventes orgânicos no eletrólito. Foram testados o Etanol, Metanol e Isopropanol.

Todas as condições avaliadas foram submetidas nas seguintes condições constantes:

- Capilar: sílica fundida de 40,2 cm de comprimento sendo 30 cm efetivos, 75 µm de d.i. e 375 µm de d.e., Beckman Coulter MDQ®;
- Detector: UV-Vis, 200, 225, 273 e 280 nm.
- Concentração da amostra: 1mg/mL.

Os ensaios realizados visando a separação enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol via Eletroforese Capilar estão listados na Tabela 10.

Tabela 10: Relação de ensaios realizados visando a separação enantiomérica de (R-S)-Bisoprolol pela técnica de Eletroforese Capilar.

Ensaio	Tampão (mM)		Proporção Amostra:Tampão (μ L)	Ciclodextrina (mM)		Solvente Orgânico (%)			pH	kV	Tempo Injeção (s)
	Tipo	Concentração		Tipo	Concentração	EtOH	MeOH	PrOH			
1	Borato	20	50:100	-	-	-	-	-	2,5	14	5
2		50	50:100	-	-	-	-	-	2,5	14	5
3	Citrato	20	50:100	-	-	-	-	-	2,5	14	5
4		50	50:100	-	-	-	-	-	2,5	14	5
5	Fosfato	20	50:100	-	-	-	-	-	2,5	14	5
6		50	50:100	-	-	-	-	-	2,5	14	5
7		50	50:100	β -CDS	10	-	-	-	2,5	8	5
8		50	50:100	β -CDS	10	-	-	-	2,5	14	5
9		50	50:100	β -CDS	10	-	-	-	2,5	20	5
10		50	50:100	β -CDS	10	-	-	-	2,5	14	3
11		50	10:100	β -CDS	10	-	-	-	2,5	14	3
12		50	40:100	β -CD	10	-	-	-	2,5	10	5

13		50	40:100	β-CD	10	-	-	-	2,5	14	5
14		50	40:100	β-CD	10	-	-	-	2,5	16	5
15		50	40:100	β-CD	20	-	-	-	2,5	10	5
16		50	40:100	β-CD	20	-	-	-	2,5	14	5
17		50	40:100	β-CD	20	-	-	-	2,5	16	5
18		50	40:100	β-CD	20	10	-	-	2,5	16	5
19		50	40:100	β-CD	20	20	-	-	2,5	16	5
20		50	40:100	β-CD	20	-	10	-	2,5	16	5
21	Fosfato	50	40:100	β-CD	20	-	20	-	2,5	16	5
22		50	40:100	β-CD	20	-	-	10	2,5	16	5
23		50	40:100	β-CD	20	-	-	20	2,5	16	5
24		75	40:100	β-CD	30	-	15	15	2,5	10	5
25		75	40:100	β-CD	30	-	15	5	2,5	16	5
26		75	40:100	β-CD	30	-	15	5	2,5	20	5
27		75	40:100	β-CD	30	-	20	5	2,5	10	5
28		75	40:100	β-CD	30	-	20	5	2,5	16	5
29		75	40:100	β-CD	30	-	20	5	2,5	20	5

30		75	40:100	β -CD	40	-	15	10	2,5	10	5
31		75	40:100	β -CD	40	-	15	10	2,5	16	5
32		75	40:100	β -CD	40	-	15	10	2,5	20	5
33		75	40:100	β -CD	40	-	20	10	2,5	10	5
34		75	40:100	β -CD	40	-	20	10	2,5	16	5
35		75	40:100	β -CD	40	-	20	10	2,5	20	5
36		75	40:100	HP β -CD	10	-	-	-	2,5	10	5
37		75	40:100	HP β -CD	20	-	-	-	2,5	10	5
38	Fosfato	75	40:100	HP β -CD	30	-	-	-	2,5	10	5
39		75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	2,5	8	5
40		75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	2,5	12	5
41		75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	2,5	20	5
42		75	40:100	HP β -CD	10	-	10	-	2,5	10	5
43		75	40:100	HP β -CD	10	-	10	-	2,5	16	5
44		75	40:100	HP β -CD	10	-	10	-	2,5	20	5
45		75	10:140	HP β -CD	30	-	10	-	2,5	10	5
46		75	10:140	HP β -CD	30	-	10	-	2,5	16	5

47	75	10:140	HP β -CD	30	-	10	-	2,5	20	5
48	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	2,5	10	5
49	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	2,5	12	5
50	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	4,8	8	5
51	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	4,8	10	5
52	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	4,8	20	5
53	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	5,4	8	5
54	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	5,4	10	5
55	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	5,4	20	5
56	Fosfato	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	4,8	8	5
57	75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	4,8	10	5
58	75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	4,8	20	5
59	75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	5,4	8	5
60	75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	5,4	10	5
61	75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	5,4	20	5
62	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	6,5	8	5
63	75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	6,5	10	5

64		75	5:145	HP β -CD	30	-	-	-	6,5	20	5
65		75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	6,5	8	5
66	Fosfato	75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	6,5	10	5
67		75	10:140	HP β -CD	30	-	-	-	6,5	20	5
68		75	10:140	HP β -CD	30	-	10	-	6,5	16	5
69		75	10:140	HP β -CD	30	-	10	-	6,5	20	5

Siglas:

β -CD: β -ciclodextrina hidratada;

β -CDS: β -ciclodextrina sulfatada (sal sódico);

HP β -CD: (2-hidroxipropil)- β -ciclodextrina.

5.2.5 Processo de Esterificação das frações coletadas de enantiômeros puros para obtenção de (R)-Bisoprolol e (S)-Bisoprolol

Para fins de caracterização e identificação das frações enantioméricas puras, visando a validação dos métodos desenvolvidos, é necessário que estas frações de (R)- Bisoprolol Base e (S)-Bisoprolol Base sejam transformadas em Fumarato de (R)- Bisoprolol e Fumarato de (S)-Bisoprolol.

Este processo consistiu em:

Pesar analiticamente 280mg do enantiômero puro. Com auxílio de 6 mL de acetona transferi-lo para um balão volumétrico de duas bocas. Esta solução foi submetida a aquecimento até atingir 40°C, em seguida foi adicionado 50 mg de ácido fumárico, pesado previamente em balança analítica. Esta mistura foi submetida à refluxo com atmosfera controlada com nitrogênio durante 30 minutos. Em seguida, a temperatura foi resfriada até 5°C através de um banho com gelo seco. A mistura foi mantida sobre resfriamento durante 1 hora. O resultado deste processo foi centrifugado e o solvente orgânico acetona evaporado.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO FUMARATO DE BISOPROLOL

Foi realizada uma varredura na região UV-vis visando estabelecer λ ideal para realização da leitura do detector. Conforme a Figura 13 é possível observar que o Fumarato de Bisoprolol possui duas bandas de absorção, e apesar da absorção máxima ocorrer em 233nm, foi observado durante a o desenvolvimento método cromatográfico que o λ ideal é o 273nm, pois a detecção dos enantiômeros é maior com este λ .

Figura 13: Espectro de Absorção do Fumarato de Bisoprolol (16 $\mu\text{g/mL}$) em hexano: isopropanol:dietanolamina (80:20:0,4 v/v/v)

6.2 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FUMARATO DE BISOPROLOL EM ESCALA SEMI-PREPARATIVA

6.2.1 Desenvolvimento e Otimização do Sistema Cromatográfico em Escala Analítica.

Devido o alto consumo de solventes orgânicos em escala semi-preparativa, os parâmetros cromatográficos devem ser desenvolvidos em escala analítica e posteriormente adaptados a escala semi-preparativa.

Ensaio foram realizados objetivando um método que possibilitasse a coleta da maior quantidade possível de frações de enantiômeros puros, sem perder a resolução, desta forma impedindo a mistura/contaminação dos enantiômeros. Portanto, quanto maior a distância entre o primeiro e segundo pico, mais favorável é a separação enantiomérica, pois com o aumento da concentração e do volume de injeção da solução racêmica os picos tendem a se aproximar e até mesmo se unirem.

O método selecionado cumpriu os requisitos necessários para realização desta separação.

Figura 14: Cromatograma da Separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol em escala analítica; Condições: FEQ Chiralcel OD $\square$ (250 x 4,6 mm d.i); FM: Hexano: PrOH: DEA (90:10:0,4 v/v/v); Detecção: 273 nm; Vazão: 1,0 mL/min; Vol. Inj.: 40 μ L; Temp.: 25 $^{\circ}$

6.2.2 Otimização do Sistema Cromatográfico em Escala Semi-Preparativa.

O método escolhido no sistema analítico foi otimizado para atender as necessidades de pressão da coluna de 70 bar e para diminuir o tempo de retenção sem perder a resolução na escala semi-preparativa.

Com o método otimizado foi possível injetar 350µL da solução racêmica estimada em 28mg/mL.

Figura 15: Cromatograma da Separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol utilizando a FEQ Chiralcel OD® (250 x 10 mm d.i); FM: Hexano: PrOH: DEA (92:8:0,4 v/v/v); Detecção: 273 nm; Vazão: 3,7 mL/min; Vol. Inj.: 350 µL; Temp.: 25 °C;

6.2.3 Determinação do Método Analítico para Separação Enantiomérica em Escala Analítica

Para ser utilizado na rotina laboratorial, o método analítico deve ser rápido e eficiente. O método desenvolvido atende a estes requisitos com uma ótima separação enantiomérica e baixos tempos de retenção.

Figura 16: Cromatograma da Separação dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol em escala analítica; Condições: FEQ Chiralcel OD $\square$ (250 x 4,6 mm d.i); FM: Hexano: PrOH: DEA (80:20:0,4 v/v/v); Detecção: 273 nm; Vazão: 1,0 mL/min; Vol. Inj.: 30 μ L; Temp.: 25 $^{\circ}$

6.3 SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA DO FUMARATO DE BISOPROLOL POR ELETROFORESE CAPILAR

O primeiro passo do desenvolvimento analítico para a obter a separação de (R)-Bisoprolol e (S)-Bisoprolol através da técnica de Eletroforese Capilar foi reproduzir as condições eletroforéticas descrito no artigo científico encontrando durante a revisão da literatura. Utilizando estes parâmetros não foi possível obter a resolução de (R)-Bisoprolol e (S)-Bisoprolol. Este tipo de evento pode ocorrer por diversos motivos, tais como: modelo de equipamento, tipo de tratamento da coluna, lote e fabricante da amostra utilizada, lote e fabricantes dos reagentes utilizados, entre outros.

Posteriormente foi realizada uma revisão bibliográfica visando encontrar parâmetros eletroforéticos envolvendo a classe de medicamentos β -Bloqueadores. Através desta busca foi possível concluir alguns direcionamentos para o desenvolvimento analítico, sendo eles:

- pH: amplamente utilizada em faixas inferiores a 3. Neste pH os grupos silanóis do capilar não se encontram dissociados, desta forma, diminui-se a interação entre fármaco e parede do capilar, otimizando os tempos de retenção;

- Tampão: A maioria dos β -Bloqueadores podem ser separados utilizando o tampão Fosfato de Sódio, onde também são encontrados os melhores resultados de resolução;

- Tipo de Ciclodextrina: a β -ciclodextrina hidratada possui a capacidade de separar aproximadamente 80% dos β -Bloqueadores, contudo, por ser neutra possui baixa solubilidade, o que dificulta muito o processo de melhora de resolução, quando necessário o aumento da concentração da ciclodextrina, limitando-se a 20mM, após longos períodos de sonificação. Durante o desenvolvimento do método, pude perceber que a solubilidade da β -ciclodextrina aumenta na presença de Isopropanol, sendo este aumento de solubilidade relativo a concentração de Isopropanol, ou seja, quanto maior a concentração de Isopropanol, maior a solubilidade da β -ciclodextrina hidratada, permitindo a utilização da concentração de 40 mM. As demais ciclodextrinas avaliadas, por serem modificadas, possuem alta solubilidade;

- Solventes Orgânicos: auxiliam na resolução entre os picos, contudo aumentam significativamente o tempo de migração.

Considerando as informações encontradas na literatura foi iniciado o desenvolvimento analítico.

Conforme descrito na Tabela 10, diversos ensaios foram realizados, e apenas em uma condição foi possível visualizar uma separação enantiomérica parcial.

Figura 17: Eletroferograma da Separação parcial dos enantiômeros do Fumarato de Bisoprolol; Condições: Capilar: sílica fundida de 40,2 cm de comprimento sendo 30 cm efetivos, 75 μm de d.i. e 375 μm de d.e., Beckman Coulter MDQ®; Eletrólito: Fosfato de Sódio 75 mM, HP β CD 30 mM, pH 2,5; 20 k, detecção UV em 200 nm.

A reprodutibilidade deste resultado não foi constante, pois em alguns ensaios, quando as mesmas condições eletroforéticas eram aplicadas os

picos se uniam, formando apenas um. Esta situação pode ser explicada devido à limitação de sensibilidade da técnica, considerando que a detecção UV ocorrer em um intervalo no capilar, denominada de janela, com 75µm de diâmetro interno, sendo um caminho óptico muito pequeno; a introdução hidrodinâmica da amostra e a baixíssima resolução dos picos ¹¹⁰.

6.4 PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES COLETADAS DE ENANTIÔMEROS PUROS PARA OBTENÇÃO DE (R)-BISOPROLOL E (S)-BISOPROLOL

O sistema de esterificação utilizado para obtenção do Fumarato de (R)-Bisoprolol e Fumarato de (S)-Bisoprolol foi o denominado Esterificação de Fisher. Este sistema se baseia na formação de um éster através da reação de um álcool e um ácido carboxílico. Neste caso, a reação ocorreu entre (R)-Bisoprolol Base e (S)-Bisoprolol Base, que possui uma hidroxila que fornece a característica de álcool e o Ácido Fumárico, um ácido dicarboxílico.

É característico de alguns compostos quirais que seus enantiômeros puros podem racemizar quando em solução. Portanto, para realizar a esterificação das frações coletadas de (R)-Bisoprolol Base e (S)-Bisoprolol Base foi realizada uma revisão bibliográfica visando encontrar a síntese

assimétrica de Fumarato de (R)-Bisoprolol e Fumarato de (S)-Bisoprolol. Este processo foi descrito em uma patente chinesa, publicada pela indústria UNICHEM Laboratórios Limitada ¹⁰⁹, este processo foi descrito no item 5.2.5 desta dissertação.

Infelizmente o resultado desta reação não foi satisfatório, pois não foi possível visualizar o processo de esterificação, este fato pode ser devido a não cristalização da substância ou a não formação do produto. Pelo processo ter sido baseado na publicação de uma patente, é possível, que por se tratar de um segredo industrial, uma ou mais fases da reação tenham sido ocultadas.

Por esse motivo, não foi possível obter os enantiômeros puros de Fumarato de (R)-Bisoprolol e Fumarato de (S)-Bisoprolol, impossibilitando a validação dos métodos desenvolvidos, visto que não são comercializados padrões enantioméricos puros no mercado atualmente.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A diferença de atividade terapêutica, farmacocinética, e/ou farmacodinâmica entre enantiômeros de compostos quirais devem ser profundamente estudadas e avaliada a possibilidade da comercialização do enantiômero puro.

O processo mais simples para separação de enantiômeros é a cromatografia líquida em escala semi-preparativa e/ou preparativa utilizando fase estacionária quiral.

O processo de obtenção dos enantiômeros puros do fármaco Fumarato de Bisoprolol proposto nesta dissertação demonstrou ser muito eficiente. A determinação das condições cromatográficas foi previamente desenvolvida em escala analítica, visando tempo de eluição rápido, uma alta resolução entre picos e injeção de altos volumes/massas do fármaco, utilizando de maneira racional o consumo dos solventes orgânicos. As condições cromatográficas da escala analítica foi transferida com sucesso para a escala semi-preparativa, possibilitando a coleta das frações de (R)-Bisoprolol e (S)-Bisoprolol.

Considerando a tendência da comercialização dos enantiômeros puros, foi desenvolvido um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com fase estacionária quiral para o controle físico-químico de (R)-

Bisoprolol e (S)-Bisoprolol. O método proposto é totalmente adequado para a rotina de um laboratório de controle de qualidade físico-químico, pois possui rápida eluição dos picos e alta resolução.

Não foi possível realizar a validação do método proposto por falta dos padrões enantioméricos puros de Fumarato de (R)-Bisoprolol e Fumarato de (S)-Bisoprolol. Estes padrões não estão disponíveis no mercado atualmente. A proposta para validação do método seria a utilização dos enantiômeros puros coletados por CLAE com fase estacionária quiral em escala semi-preparativa. Contudo, o processo de obtenção do Fumarato de (R)-Bisoprolol e Fumarato de (S)-Bisoprolol através do processo de esterificação das frações coletadas de (R)-Bisoprolol Base e (S)-Bisoprolol Base não foi satisfatório.

Foi estudado o desenvolvimento de um método de separação enantiomérica do Fumarato de Bisoprolol através da técnica de Eletroforese Capilar. Os resultados encontrados não foram satisfatórios, sendo necessários novos estudos para aumentar a resolução entre os picos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.48, 175-188, 2001.
2. ABOUL-ENEIN, H.Y. *Anal. Lett.*, v.26, 271-279, 1993.
3. ABOUL-ENEIN, H.Y.; ABOU-BASHA, L.I. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, v.19, 383-392, 1996.
4. AHUJA, S. *Chiral separation by liquid chromatography*. Washington: American Chemical Society, 1991. 239p.
5. ANDERSSON, S.; ALLENMARK, S.G. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.54, 11-23, 2002.
6. AUMATELL, ANTHONY; WELLS, ROBERT J. *J. Chromatogr., A*, v.688, 329-337, 1994.
7. BACZUK, R.J.; LANDRAM, G.K.; DUBOIS, R.J.; DEHM, H.C. *J. Chromatogr.*, v.60, 351-361, 1971.
8. BALMER, K.; LAGERSTOM, P.; PERSSON, B. *J. Chromatogr.*, v.592, 331-337, 1992.
9. BALMER, K.; PERSSON, A.; LAGERSTROM, P.; PERSSON, B.; SCHILL, G. *J. Chromatogr.*, v.553, 391-397, 1991.
10. BARTSCH W; SPONER G; STREIN K; MULLER-BECKMANN B; KLING L; BOHM E; MARTIN U; BORBE H O. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v.38, S104-S107, 1990.
11. BEHN, F.; MICHELS, S.; LAER, S.; BLASCHKE, G. *J. Chromatogr. B*, v.755, 111 –117, 2001.
12. CALDWELL, J. *J. Chromatogr.*, v.719, 3-13, 1996.
13. CHILMONCZYK, ZDZISLAW; KSYCINSKA, HANNA; ABOUL-ENEIN, HASSAN Y.; LEE, WON-JAE. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, v.24, 2505-2512, 2001.
14. CHING, M.S.; LENNARD, M.S.; GREGORY, A.; TUCKER, G.T. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, v.497, 313-318, 1989.
15. CHIRAL APPLICATION GUIDE V. Morton Grove: Regis Technologies, 2005, 88p.

16. CLOHS, L.; MCERLANE, K. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , v. 31, 407- 412, 2003.
17. CLOHS, L.; MCERLANE, K. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* ,v.24, 545–554, 2001.
18. 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: 21 maio 2004.
19. DAVANKOV, V.A. *Chirality*, v.9, 99-102, 1997.
20. DEF 2004/2005 dicionário de especialidades farmacêuticas. 33.ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2004.
21. EGGINGER, G.; LINDNER, W.; KAHR, S.; STOSCHITZKY, K. *Chirality*, v.5, 505-512, 1993.
22. EKBORG-OTT, K.H.; LIU, Y.; ARMSTRONG, D.W. *Chirality*, v.10, 434-483, 1998.
23. EKELUND, J.; ARKENS, A.V.; BRONNUM-HANSEN, K.; FICH, K.; OLSEN, L.; PETERSON, P.V. *J. Chromatogr., A*, v.708, 253-261, 1995.
24. ERIKSSON, T. *Chirality*, v.7, 44-52, 1995.
25. FERRETI, R.; GALLINELLA, B.; TORRE, L.A.F.; VILLANI, C. *J. Chromatogr.*, v.704, 217-223, 1995.
26. FRANCOTTE, E. *J. Chromatogr. A* v.666, 565-601, 1994.
27. FRANCOTTE, E.; JUNKER-BUCHHEIT, A. *J. Chromatogr.* v.576, 1-45, 1992.
28. FRANCOTTE, E.R.; RICHERT, P. *J. Chromatogr. A.*, v.769, 101-107, 1997.
29. FUKUHARA, T.; ISOYAMA, M.; SHIMADA, A.; ITOH, M.; YUASA, S. *J. Chromatogr.*, v.387, 562-565, 1987.
30. GAGYI, L.;GYÉRESI, A.; KILÁR, F. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v.70 1268–1275, 2008.
31. GULAI, A. A.; HOUGHTON, G. W.; BOOBIS, A. R. *J. Chromatogr. A*, v.318, 393-397, 1985.
32. HEUERMAN, M.; BLASCHKE, G. *J. Chromatogr.* , v.648, 267-274, 1996.
33. HORIKIRI, YUJI; SUZUKI, TAKEHIKO; MIZOBE, MASAKAZU. *J. Pharm. Sci.*, v.86, 560-564, 1997.

34. HORIKIRI, YUJI; SUZUKI, TAKEHIKO; MIZOBE, MASAKAZU. *J. Pharm. Sci.*, v.87, 289-294, 1998.
35. ITOH, T.; YAMADA, H. *J. Chromatogr.*, v.694, 195-208, 1995.
36. JIRA, T.; BREYER, CHRISTIANE. *Pharmazie*, v.48, 829-833, 1993.
37. KAIDA, Y.; OKAMOTO, Y. *Chem. Lett.*, v.1, 85-88, 1992.
38. KOPPENHOEFER, B.; EPPERLELN, U.; CHRISTIAN, B.; LIN, B.; JI, Y.; CHEN, Y. *J. Chromatogr. A*, v.735, 333-343, 1996.
39. KUROEDOV, ALEXEY; COSENTINO, FRANCESCO; LUESCHER, THOMAS F. *Cardiovascular Drug Reviews*, v.22, 155-168, 2004.
40. LAMPRECHT, G.; GRUBER, L.; STOSCHITZKY, K.; LINDNER, W. *Chromatographia*, v.56(Suppl.), S25-S29, 2002.
41. MACHIDA, YOSHIO; NISHI, HIROYUKI; NAKAMURA, KOUJI; NAKAI, HIDEO; SATO, TADASHI. *J. Chromatogr., A*, v.757, 73-79, 1997.
42. MCNEELY, WENDY; GOA, KAREN L. *Drugs*, v.57, 633-651, 1999.
43. MEHVAR, R.; BROCKS, D.R. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, v.4, 185-200, 2001.
44. MILLER, L.; HONDA, D.; FRONEK, R.; HOWE, K. *J. Chromatogr. A*, v.658, 429-435, 1994.
45. MISTRY, B.; LESLIE, J.L.; EDDINGTON, N.D. *J. Chromatogr., B*, v.758, 153-161, 2001.
46. MOHMOUD, H. M.; ABD-ALRAHMAN, S. M.; MOHAMED, A. M. *Chem Pharm Bull*, v.55, 227-230, 2007.
47. MOSTAFAVI, S. ABOLFAZL; FOSTER, ROBERT T. *Biopharm. Drug Disposition*, v.19, 425-431, 1998.
48. NAGAMATSU, S.; MURAZUMI, K.; MAKINO, S. *J. Chromatogr.*, v.832, 55-65, 1999.
49. NATHANSON, J.A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.245, 94-101, 1988.
50. NEUGEBAUER G; GABOR M; REIFF K. *J. Cardiovas. Pharmacol.*, v.19 Suppl, S142-146, 1992.

51. NICHOLS, ANDREW J.; SULPIZIO, ANTHONY C.; ASHTON, DARYL J.; HIEBLE, J. PAUL; RUFFOLO, ROBERT R., JR. *Chirality*, v.1, 265-270, 1989.
52. OHAMED, M.; HEFNAWY, A.; MAHA, A.; SULTAN, A.; MONA, M. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.29,2901-2914, 2006.
53. OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; KAIDA, Y.; HATADA, K.; INOTSUME, N.; NAKANO, M. *Chirality*, v.1, 239-242, 1989.
54. OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. *J. Chromatogr.*, v.666, 403-419, 1994.
55. OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K. *J. Am. Chem. Soc.*, v.106, 5357-5359, 1984.
56. PIQUETTE-MILLER M; FOSTER R T; KAPPAGODA C T; JAMALI F. *J. Pharm. Sci.*, v.80, 313-316, 1991.
57. PIQUETTE-MILLER, M.; FOSTER, R. T.; PASUTTO, F. M.; JAMALI, F. *J. Chromatogr.*, v.526, 129-137, 1990.
58. PIQUETTE-MILLER, M.; JAMALI, F. *Agents and Actions*, v.37, 290-296, 1992.
59. PIRKLE, W.H.; BURKE, J.A. *J. Chromatogr.*, v.557, 173-185, 1991.
60. PIRKLE, W.H.; FINN, J.M.; SCHREINER, J.L.; HAMPER, B.C. *J. Am. Chem. Soc.*, v.103, 3964-3966, 1981.
61. PIRKLE, W.H.; McCUNE J.E. *J. Chromatogr.*, v.469, 67-75, 1989.
62. PIRKLE, W.H.; POCHAPSKY, T.C. *Chem. Rev.*, v.89, n.2, 347-362, 1989.
63. REPORT by D. Paul Cohen, The independent research group, Chiral Quest, Inc. October, 2003.
64. SANTORO, M.I.R.M. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v.28, 1-29, 1992.
65. SANTORO, M.I.R.M.; CHO, H.S.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. *Drug Dev. Ind. Pharm.* v.27, 693-697, 2001.
66. SANTORO, M.I.R.M.; SINGH, A.K. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, v.37, no. 3, 259-268, 2001.
67. SANTORO, M.I.R.M.; SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, v.26, n. 4, 507-517, 2003.
68. SCHMID M G; GUBITZ G; KILAR F. *Electrophoresis*, v.19, 282-287, 1998.

69. SCHMIDT J. *Perfusion*, v.8, 291-296, 1995.
70. SINGH, A.K. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas–USP, 2002. 263p.
71. SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. INTERNATIONAL* v.84, 1724-1729, 2001.
72. SPONER, G.; STREIN, K.; BARTSCH, W.; MUELLER-BECKMANN, B. *J. Cardiovas. Pharmacol.*, v.19, S5-S11, 1992.
73. 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. *J. Pharm. Sci.*, v.85, 299-303, 1996.
74. STOSCHITZKY, KURT; KOSHUCHAROVA, GERGAN; LERCHER, PETER; MAIER, ROBERT; SAKOTNIK, ANDREA; KLEIN, WERNER; LIEBMANN, PETER M.; LINDNER, WOLFGANG. *Chirality*, v.13, 342-346, 2001.
75. SUZUKI, TAKEHIKO; HORIKIRI, YUJI; MIZOBE, MASAKAZU; NODA, KAZUO. *J. Chromatogr., B*, v.619, 267-273, 1993.
76. SVENSSON, S.; VESSMAN, J.; KARLSSON, A. *J. Chromatogr.*, v.839, 23-39, 1999.
77. SZYMURA-OLEKSIK, JOANNA; WALCZAK, MARIA; BOJARSKI, JACEK; ABOUL-ENEIN, HASSAN Y. *Chirality*, v.11, 267-271, 1999.
78. TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. *J. Chromatogr.*, v.906, 127-154, 2001.
79. UNITED States Pharmacopeia: USP 28: the National Formulary: NF 23 : Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2004.
80. UZUKI, T.; HORIKIRI, Y.; MIZOBE, M.; NODA, N. *J. Chromatogr.* v.619, 267-273, 1993.
81. VAN NUETEN, L.; DE CREE, J. *Janssen Cardiovascular Drugs and Therapy*, v.12, 339-344, 1998.
82. VANDENBOSCH, C.; MASSART, D. L.; LINDNER, W. *Analytica Chimica Acta*, v.270, 1-12, 1992.
83. WAINER, I.W. *Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology*. 2.ed. New York: Dekker, 1993. 139-182.
84. WEN, Y. H.; WU, S. S.; WU, H. L. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, v.18, 3329-3345, 1995.
85. WILLIAMS, KAREN L.; SANDER, LANE C.; WISE, STEPHEN A. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.15, 1789-1799, 1997.

86. KHONNEUX, R; WOUTERS, L; RENEMAN, R. S.; JANSSEN, P. *A. Eur. J. Pharmacol.* v. 181, 261-265, 1990.
87. YANG, ERIC; WANG, SHERRY; KRATZ, JOHN; CYRONAK, MATTHEW J. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.36, 609-615, 2004.
88. YASHIMA, E. *J. Chromatogr.*, v.906, 105-125, 2001.
89. YASHIMA, E.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. *J. Am. Chem. Soc.*, v.118, 4036-4048, 1996.
90. YUAN, ZUYI; SHIOJI, KEISUKE; KIHARA, YASUKI; TAKENAKA, HIROYUKI; ONOZAWA, YOKO; KISHIMOTO, CHIHARU. *Am. J. Physiol.*, v.286, H83-H90, 2004.
91. ZHANG, X.; OUYANG, J.; BAEYENS, W.R.G.; ZHAI, S.; YANG, Y.; HUANG, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , v.31,1047- 1057, 2003.
92. ALI, I.;GAITONDE, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; HUSSAIN, A.; *Talanta*, v.78, 458-463, 2008.
93. ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v.877, n.23, p.2224-2234, 2009.
94. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Leiçlação. VisaLegis. Resolução RDC n.17, de 16 de abril de 2010. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis>. Acesso em: 01.12. 2010.
95. CHANKVETADZE, B. *Capillary Eletrophoresis in Chiral Analysis*. England:John &Sons LTD, 1997. 141-149 p.
96. CHO, H. S. *Análise de fármacos em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase quiral*. 1998. 177f. Tese (Doutorado em Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
97. GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L., eds. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. 1821p.
98. HEFNAWY, M. M.; SULTAN, M. A.; AL-SHEHRI, M. M. *Journal of Chromatography & Related Technologies*, v.29, 2901-2914, 2006.

99. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 2005. Disponível em: http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf. Acesso em: 21.11.2010
100. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, p.771-780, 2004.
101. TAVENIERS, I.; LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, v.23, p.535-551, 2004.
102. UNITED States Pharmacopeia: USP33. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010. v.1, p.773-777.
103. WHITE, C. A.; SUBRAMANIAN, G. An introduction to Enantioseparation by liquid chromatography. In: SUBRAMANIAN, G. *A practical approach to chiral separation by liquid chromatography*. Weinheim:VCH, 1994. 1-17p.
104. SILVA, P., ed. *Farmacologia*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
105. ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Applications of polysaccharide – based chiral stationary phases for resolution of different compound classes. In: GÜBITZ, G.; SHMID, M. G. *Chiral Separations: methods and protocols*. New Jersey:Humana Press, 2004. 183-196p.
106. OLIVEIRA, M .A.; BERMUDEZ, J. A. Z.; SOUZA, A. C. M. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada?. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, jan. 1999 . Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1999000100011&lng=pt&nrm=iso. acessos em 01 dez. 2011.
107. LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 5, out. 2001. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000500016&lng=pt&nrm=iso. acessos em 01 dez. 2011.

108. MOKHIBER, R., Talidomida. In: *Crimes Corporativos: O Poder das Grandes Empresas e o Abuso da Confiança Pública* (R. Mokhiber, org.), pp.369-376, São Paulo: Ed. Página Aberta, 1995.
109. UNICHEM Laboratories Limited. A novel process for the synthesis of bisoprolol and its intermediate. IN2006/000358. 21 Jun 2007.
110. MIRANDA, C. E. S., Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (fia –Ce): desafios, aplicações e perspectivas. *Química Nova*, v.25, p. 412-419, 2002.