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

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos
enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e
sotalol

Michele Bacchi Pallastrelli

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo
2013

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

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos
enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e
sotalol

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Michele Bacchi Pallastrelli

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

P164p Pallastrelli, Michele Bacchi
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol / Michele Bacchi Pallastrelli. -- São Paulo, 2013.
228p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Singh, Anil Kumar

1. Cromatografia líquida de alta eficiência : Isômero: Farmacologia
2. Insumos farmacológicos I. T. II. Singh, Anil Kumar, orientador.

615.19015 CDD

Michele Bacchi Pallastrelli

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos
enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e
sotalol

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Anil Kumar Singh
Orientador/ Presidente

1° Examinador

2° Examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus pais Jorge e Rachel, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade e da perseverança. Agradeço a vocês por tudo o que fizeram por mim até hoje, por sempre estarem ao meu lado e por me amarem incondicionalmente.

À minha irmã, e amiga, Luciana, que mesmo estando a vários quilômetros de distância, sempre me apoiou e me deu carinho.

Ao meu noivo Murillo, que além de me fazer feliz, me estimulou a conquistar um lugar ao sol.

À minha tia Eunice e meu tio João, por sempre estarem de portas abertas para me receber.

Ao meu orientador, Anil K. Singh, pela transmissão de seus conhecimentos.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial à Cíntia, Flávia, Harry Léo, Natanael, Diego e Augusto pela amizade, troca de experiências e colaboração.

Ao David e à Iria, pela atenção e ajuda.

A todos vocês e àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta imensa felicidade que estou sentindo nesse momento, meu muito obrigada.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas...”

(Luis Fernando Veríssimo)

Resumo

PALLASTRELLI, M.B. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol**. 2013. 228 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A maioria dos medicamentos normalmente prescritos são comercializados sob a forma racêmica, apesar de se ter conhecimento que a presença de diferentes enantiômeros em uma formulação farmacêutica pode levar a diferentes atividades farmacológicas, farmacocinéticas e perfis toxicológicos. O uso de enantiômeros puros em formulações farmacêuticas pode resultar em melhor ajuste de dose e diminuição dos efeitos adversos, fato que torna estudos a respeito de quiralidade de moléculas fundamental na área farmacêutica.

Atualmente, os métodos analíticos mais empregados para a separação e determinação da pureza enantiomérica de compostos são a CLAE-FEQ e eletroforese capilar com seletos quirais. Os enantiômeros de esmolol foram separados através de CLAE-FEQ em fase reversa utilizando coluna Chiralcel-OD-RH (250 x 4,6 mm d.i.), 5 μm . A fase móvel foi composta por perclorato de potássio 100 mM, pH 2,08 : acetonitrila : dietilamina (80:20:0,2) com vazão de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção a 220 nm. Os enantiômeros de esmolol também foram separados através de CLAE-FEQ em fase normal utilizando coluna Chiralcel-OD (250 x 4,6 mm d.i.), 10 μm . A fase móvel foi composta por hexano : etanol : dietilamina (75:25:0,2) com vazão de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção a 220 nm. Ambos os métodos foram validados, sendo possível considerá-los precisos, seletivos, específicos, exatos e lineares para quantificar os enantiômeros de esmolol em medicamentos. Os testes realizados com cloridrato de sotalol por CLAE não indicaram separação enantiomérica ao serem utilizadas coluna Chiralcel OD®, Chiralcel OD-RH®, Burke e Whelk®. Os ensaios realizados por eletroforese capilar apresentaram separação parcial dos enantiômeros de sotalol e de esmolol, porém houve ausência de reprodutibilidade do método.

Palavras-chave: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Eletroforese Capilar. Enantiômero. Esmolol. Sotalol.

Abstract

PALLASTRELLI, M.B. **Development and validation of enantioselective analytical methods for separation and determination of esmolol and sotalol**. 2013. 228 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Most commonly prescribed drugs are marketed as racemic mixtures, even though it is well known that the presence of different enantiomers in a pharmaceutical formulation can lead to different pharmacological, pharmacokinetic and toxicological profiles. The use of pure enantiomers in pharmaceutical formulations can result in better dose adjustment and reduction of side effects, fact which makes studies on molecular chirality important to the pharmaceutical area. Currently, high performance liquid chromatography using chiral stationary phases (CSPs) and capillary electrophoresis with chiral selectors are the most commonly methods employed for the separation and determination of enantiomeric purity of compounds. The enantiomers of esmolol were separated through HPLC using a reversed phase CSP column Chiralcel-OD-RH (250 x 4,6 mm i.d.) 5 μ m. The mobile phase was composed of 100 mM potassium perchlorate, pH 2,08 : acetonitrile: diethylamine (80:20:0,2) at a flow rate of 0,5 mL.min⁻¹ and detection at 220 nm. The enantiomers of esmolol were also separated using HPLC-CSP using normal phase column Chiralcel OD (250 x 4,6 mm i.d.), 10 μ m. The mobile phase consisted of hexane : ethanol : diethylamine (75:25:0,2) with a flow rate of 1,0 mL.min⁻¹ and detection at 220 nm. Both methods were validated, and it was possible to consider them precise, selective, specific, exact and linear to quantify the enantiomers of esmolol on drugs. HPLC tests conducted with sotalol indicated no enantiomeric separation when Chiralcel OD, Chiralcel OD-RH, Burke and Whelk columns were used. Capillary electrophoresis tests showed partial separation of the enantiomers of sotalol and esmolol, but there was lack of reproducibility.

Keywords: Capillary Electrophoresis. Enantiomer. Esmolol. High Performance Liquid Chromatography. Sotalol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AGP	α_1 -ácido glicoproteína
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD	Ciclodextrina
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Eletroforese capilar)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DEA	Dietilamina
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
d.i.	Diâmetro interno
ESM	Esmolol
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEQ	Fase estacionária quiral
Hex	Hexano
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IPA	Isopropanol
k'	Fator de capacidade
LC-DAD	Cromatógrafo a líquido acoplado a detector de arranjo de diodos
LC-MS/MS	Cromatógrafo a líquido acoplado a espectrômetro de massas em <i>tandem</i>
LC-ESI/MS	Cromatógrafo a líquido com ionização por <i>electrospray</i> acoplado a espectrômetro de massas
LC-UV	Cromatógrafo a líquido acoplado a detector de ultravioleta
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
mM	Milimolar
N	Número de pratos teóricos

pH	Potencial hidrogeniônico
pK _a	Constante de dissociação ácida
R _s	Resolução
RDC	Resolução da diretoria colegiada (da ANVISA)
SOT	Sotalol
T	Fator de Assimetria (<i>tailing factor</i>)
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopéia Americana)
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Mobilidade eletroforética	53
Equação 2 – Velocidade eletroforética.....	56
Equação 3 – Equação de primeira ordem	82
Equação 4 – Desvio padrão relativo.....	85
Equação 5 – Repetibilidade.....	86
Equação 6 - Exatidão	90
Equação 7 - Fator de capacidade	95
Equação 8 – Seletividade.....	95
Equação 9 - Resolução	96
Equação 10 – Fator de Assimetria	96
Equação 11 - Pratos teóricos	97
Equação 12 – Exatidão através do método de adição de padrão	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ligação do enantiômero ao receptor, baseado no modelo de três pontos de interação (adaptado) (McCONALTHY, 2003)	28
Figura 2 – Estrutura de α , β , e γ -ciclodextrina (VENTURINI et al., 2008)	46
Figura 3 – Encaixe do soluto em cavidade de ciclodextrina (SNYDER et al., 1997).46	
Figura 4 – Esquema de um sistema de eletroforese capilar (adaptado) (XU, 1996).53	
Figura 5 – Migração de solutos neutro, aniônico e catiônico em um capilar devido ao fluxo eletroosmótico e mobilidade eletroforética (adaptado) (BAKER, 1995)	54
Figura 6 – Representação do fluxo eletroosmótico em um capilar (adaptado) (BAKER, 1995).....	56
Figura 7 – Fórmula estrutural do esmolol (adaptado) (MARTINDALE, 2009)	61
Figura 8 – Fórmula estrutural do sotalol (adaptado) (MARTINDALE, 2009)	64
Figura 9 – Determinação gráfica da faixa de linearidade e da faixa dinâmica em cromatografia, de acordo com a IUPAC (adaptado) (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1993).....	83
Figura 10 – Parâmetros considerados para adequabilidade do sistema.....	94
Figura 11 – Separação de picos indicada pela resolução (R_s) (adaptado) (UNITED STATES, 1994)	96
Figura 12– Parâmetros considerados para o parâmetro de assimetria.....	97
Figura 13 – Espectro de ultravioleta do cloridrato de esmolol em pH variando entre 2 e 11	137
Figura 14 - Espectro de ultravioleta do cloridrato de esmolol em diferentes solventes	138
Figura 15 - Espectro de ultravioleta do cloridrato de sotalol em pH variando entre 2 e 11	138
Figura 16 - Espectro de ultravioleta do cloridrato de sotalol em diferentes solventes	139
Figura 17 - Espectro de UV do cloridrato de esmolol obtido em fase reversa por CLAE	140
Figura 18 - Espectro de UV do cloridrato de esmolol obtido em fase normal por CLAE	146
Figura 19 - Espectro de UV do cloridrato de sotalol obtido em fase reversa por CLAE	151

Figura 20 - Espectro de UV do cloridrato de sotalol obtido em fase normal por CLAE	155
Figura 21 – Cromatogramas referentes à seletividade / especificidade do método em fase reversa.....	158
Figura 22 - Curva de calibração do primeiro de pico de esmolol.....	159
Figura 23 - Curva de calibração do segundo de pico de esmolol.....	159
Figura 24 – Cromatogramas referentes à seletividade / especificidade do método em fase normal.....	162
Figura 25 - Curva de calibração do primeiro de pico de esmolol.....	163
Figura 26 - Curva de calibração do segundo de pico de esmolol.....	163
Figura 27 - Grupamentos de cloridrato de esmolol protonados em função do pH do meio (Fonte: Chemicalize).....	166
Figura 28 - Grupamentos de cloridrato de sotalol protonados em função do pH do meio (Fonte: Chemicalize).....	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química de FEQs derivadas de amilose e celulose (THOMPSON, 2005)	44
Tabela 2 - Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CLAE.....	68
Tabela 3 - Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CE	71
Tabela 4 – Parâmetros para a validação de métodos analíticos de acordo com a RE nº 899.....	78
Tabela 5 – Limites percentuais de teor de analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos de acordo com a RE nº 899	84
Tabela 6 – Parâmetros de adequabilidade do sistema e recomendações (SNYDER et al., 1997; UNITED STATES, 2000)	93
Tabela 7 - Amostras de esmolol e sotalol selecionadas para o estudo.....	100
Tabela 8 - Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD-RH®	106
Tabela 9 - Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD®.....	110
Tabela 10 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Chiralcel OD-RH®	115
Tabela 11 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Burke®.....	118
Tabela 12 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Whelk®	120
Tabela 13 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Chiralcel OD®.....	122
Tabela 14 - Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol por eletroforese capilar.....	125
Tabela 15 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol por eletroforese capilar.....	128
Tabela 16 - Temperaturas de fusão aferidas para cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol.....	139

Tabela 17 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®.....	141
Tabela 18 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase normal utilizando coluna Chiralcel OD®	147
Tabela 19 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de sotalol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®.....	152
Tabela 20 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de sotalol em fase normal utilizando coluna Chiralcel OD®	156
Tabela 21 – Dados referentes à exatidão do método para cloridrato de esmolol utilizando fase reversa	160
Tabela 22 – Dados referentes à precisão do método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase reversa	161
Tabela 23 – Limite de quantificação e limite de detecção referentes ao método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase reversa	161
Tabela 24 – Dados referentes à exatidão do método para cloridrato de esmolol utilizando fase normal	164
Tabela 25 – Dados referentes à precisão do método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase normal	165
Tabela 26 – Limite de quantificação e limite de detecção referentes ao método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase normal	165

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	OBJETIVO	22
3.	JUSTIFICATIVA.....	23
4.	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
4.1.	Quiralidade e enantiômeros.....	25
4.2.	A importância da quiralidade na área farmacêutica	27
4.3.	Impurezas enantioméricas	30
4.4.	Nomenclatura.....	31
4.5.	Separação quiral.....	34
4.5.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	36
4.5.2.	Eletroforese capilar (CE)	52
4.6.	β -bloqueadores.....	59
4.6.1.	Esmolol.....	61
4.6.2.	Sotalol.....	64
4.7.	Separação enantiomérica de esmolol e sotalol.....	67
4.8.	Validação de métodos analíticos	76
4.8.1.	Especificidade / Seletividade	79
4.8.2.	Linearidade.....	81
4.8.3.	Intervalo.....	84
4.8.4.	Precisão.....	85
4.8.5.	Limite de detecção.....	88
4.8.6.	Limite de quantificação	89
4.8.7.	Exatidão.....	90
4.8.8.	Robustez	91
4.8.9.	Adequabilidade do sistema.....	92
4.8.10.	Cálculos teóricos	94
4.8.11.	Fatores que podem afetar a adequabilidade do sistema	98
5.	MATERIAIS E MÉTODO	99
5.1.	Materiais	99
5.1.1.	Reagentes e solventes	99
5.1.2.	Substâncias químicas de referência	100

5.1.3.	Medicamentos	100
5.1.4.	Equipamentos.....	100
5.1.5.	“Softwares”	102
5.2.	Métodos	102
5.2.1.	Espectrofotometria de absorção no ultravioleta.....	102
5.2.2.	Determinação do ponto de fusão.....	103
5.2.3.	Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo de cloridrato de esmolol por CLAE	104
5.2.4.	Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo de cloridrato de sotalol por CLAE	113
5.2.5.	Desenvolvimento de método de separação para cloridrato de esmolol utilizando eletroforese capilar	122
5.2.6.	Desenvolvimento de método de separação para cloridrato de sotalol utilizando eletroforese capilar	127
5.2.7.	Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase reversa	130
5.2.8.	Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase normal	134
6.	RESULTADOS.....	137
6.1.	Determinação dos espectros de absorção em ultravioleta	137
6.2.	Determinação do ponto de fusão	139
6.3.	Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo por CLAE para cloridrato de esmolol	140
6.3.1.	Desenvolvimento de método de separação utilizando CLAE em fase reversa	140
6.3.2.	Desenvolvimento de método de separação utilizando CLAE em fase normal	146
6.3.3.	Desenvolvimento de método utilizando CLAE em escala semi-preparativa	150
6.4.	Desenvolvimento de método de separação enantiosseletiva por CLAE para cloridrato de sotalol	150
6.4.1.	Desenvolvimento de método de separação utilizando Chiralcel OD-RH150	

6.4.2.	Desenvolvimento de método de separação utilizando CLAE em fase normal	155
6.4.3.	Desenvolvimento de método de separação utilizando coluna Burke...	157
6.4.4.	Desenvolvimento de método de separação utilizando coluna Whelk®	157
6.5.	Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo por eletroforese capilar para cloridrato de esmolol	157
6.6.	Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo por eletroforese capilar para cloridrato de sotalol	157
6.7.	Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase reversa	158
6.7.1.	Seletividade / Especificidade	158
6.7.2.	Curva de Calibração	159
6.7.3.	Exatidão	160
6.7.4.	Precisão	160
6.7.5.	Limite de quantificação e limite de detecção	161
6.8.	Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase normal	161
6.8.1.	Seletividade / Especificidade	161
6.8.2.	Curva de Calibração	163
6.8.3.	Exatidão	164
6.8.4.	Precisão	164
6.8.5.	Limite de quantificação e limite de detecção	165
7.	DISCUSSÃO	166
7.1.	Determinação dos espectros de absorção em ultravioleta	166
7.2.	Determinação do ponto de fusão	168
7.3.	Determinação enantiomérica por CLAE	168
7.3.1.	Determinação dos enantiômeros de cloridrato de esmolol empregando CLAE	169
7.3.2.	Determinação dos enantiômeros de cloridrato de sotalol empregando CLAE	175
7.4.	Determinação enantiomérica por eletroforese capilar	177
7.4.1.	Determinação dos enantiômeros de cloridrato de esmolol empregando eletroforese capilar	177

7.4.2. Determinação dos enantiômeros de cloridrato de sotalol empregando eletroforese capilar	178
7.4.3. Validação dos métodos de separação para cloridrato de esmolol em fase reversa e fase normal.....	179
8. CONCLUSÕES.....	180
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	182
APÊNDICE A – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de esmolol por CLAE em fase reversa	200
APÊNDICE B – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de esmolol por CLAE em fase normal	205
APÊNDICE C – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE em fase reversa	211
APÊNDICE D – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE em fase normal	215
APÊNDICE E – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE UTILIZANDO COLUNA BURKE	217
APÊNDICE F – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE UTILIZANDO COLUNA WHELK®	219
APÊNDICE G – Eletroferogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de esmolol por eletroforese capilar.....	221
APÊNDICE H – eletroferogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por eletroforese capilar.....	225

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo fármacos quirais foram comercializados como racematos. No entanto, com o avanço da ciência, foi possível adquirir o conhecimento de que a maioria dos fármacos existe na forma opticamente ativa e das diferenças nas atividades biológicas existentes entre os pares de enantiômeros. Por muitos anos o isomerismo das moléculas foi ignorado, o que levou à ocorrência de consequências graves. O caso da talidomida, medicamento administrado em gestantes para tratar enjoo que gerou diversos relatos de teratogenicidade e focomelia associado ao seu uso, é um exemplo clássico de isomerismo que gerou consequências importantes. Estudos sobre esta substância confirmaram que apenas um enantiômero (forma R-) possuía a atividade desejada, enquanto que o seu antípoda (enantiômero apostro) apresentava propriedades teratogênicas. Também foi comprovado por estudos que este fármaco sofria inversão de configuração *in vivo*, tornando o seu uso restrito em casos excepcionais.

Fármacos quirais são muito intrigantes e, às vezes, negligenciados devido às limitações em correlacionar parâmetros físicos e biológicos e de se obter métodos de separação enantiomérica que possuam baixo custo. Porém, é de extrema importância realizar separação quiral e analisar fármacos racêmicos na indústria farmacêutica, a fim de eliminar e/ou controlar a formação do isômero indesejado da preparação. Da mesma forma, é importante realizar avaliação clínica para que se possa encontrar o tratamento ideal para o paciente e haver controle terapêutico adequado.

A obtenção de enantiômeros opticamente puros se dá basicamente através da síntese estereosseletiva ou por resolução da mistura racêmica por cromatografia líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral. O desenvolvimento de fármacos quirais como racematos e enantiômeros únicos tornou necessário o desenvolvimento de métodos específicos para a separação quiral, já que esta operação desempenha um papel fundamental não só na indústria farmacêutica como também na clínica terapêutica.

Na tentativa de reduzir os riscos causados pelos enantiômeros, o *Food and Drug Administration* (FDA) em 1992 passou a adotar novas diretrizes para o registro

de novos fármacos quirais. O FDA e outras agências regulatórias passaram a recomendar que a produção de enantiômeros fosse feita na forma de enantiômeros puros além de, atualmente, exigir que para o registro de novos fármacos quirais todos os estudos pré-clínicos sejam realizados com os enantiômeros isolados, bem como exige o estabelecimento das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos enantiômeros isolados.

Apesar dos pontos anteriormente citados, muitos fármacos ainda são utilizados sob a forma de racematos devido aos altos custos e dificuldades práticas para produzir enantiômeros puros e também devido à dificuldade de se obter técnicas de separação quiral específicas para cada medicamento. Entre as dificuldades para a produção de enantiômeros puros, está a presença do antípoda na matéria-prima quando se utiliza a rota de síntese enantiosseletiva que, mesmo estando presente em quantidade baixa, é considerado como uma impureza não desejada e deve ser monitorada.

Se forem desenvolvidos métodos para obtenção de enantiômeros puros e para separação quirállica de fármacos e estes possuírem aplicação em grande escala e custo relativamente baixo, as empresas poderiam substituir ou retirar do mercado produtos que não possuam qualidade e segurança adequada. Desta forma, a quantidade de medicamentos racêmicos comercializados poderia diminuir significativamente, uma vez que se tenham disponíveis insumos para a produção de medicamentos com enantiômeros puros e métodos adequados para sua detecção e quantificação em medicamentos.

O presente trabalho tem como objetivo propor e validar metodologias para resolução dos enantiômeros de cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol por meio das técnicas analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando fase estacionária quiral e eletroforese capilar utilizando seletor quiral para que seja possível quantificá-los em medicamentos, de forma rápida e pouco onerosa. Apesar de haver artigos publicados propondo a separação de cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol, a maioria destes artigos não apresenta dados suficientes (resolução, tempo total de ensaio, cromatogramas, entre outros) para avaliar se houve separação efetiva dos enantiômeros.

Os princípios ativos cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol foram escolhidos pelo fato de as doenças cardiovasculares serem as maiores causadoras

de morte no mundo e, pelo fato de haver um grande número de pessoas acometidas por hipertensão, que é uma das indicações de uso destes medicamentos. Ambos os princípios ativos pertencem à classe dos betabloqueadores e seus enantiômeros possuem efeitos farmacológicos diferentes.

2. OBJETIVO

O objetivo deste projeto de pesquisa foi ampliar os conhecimentos ligados aos métodos de análise enantiomérica de fármacos quirais, em especial, dos betabloqueadores esmolol e sotalol e suas impurezas enantioméricas.

Como pontos específicos dessa pesquisa destacaram-se:

- Separação enantiomérica do esmolol e sotalol e seus antípodas em escala analítica e semi-preparativa através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral;
- Separação enantiomérica do esmolol e sotalol e seus antípodas através de eletroforese capilar;
- Purificação e obtenção do cloridrato de R-esmolol, cloridrato de S-esmolol, cloridrato de R-sotalol e cloridrato de S-sotalol utilizando coluna quiral em escala semi-preparativa;
- Aplicação dos métodos desenvolvidos em escala analítica, para quantificação de R-esmolol, S-esmolol, R-sotalol e S-sotalol em medicamentos.

3. JUSTIFICATIVA

O conhecimento de que grande parte dos fármacos existe na forma opticamente ativa e das diferenças nas atividades biológicas entre os pares de enantiômeros faz crescer a demanda por fármacos enantiomericamente puros. Devido à semelhança nas estruturas e, portanto, nas propriedades dos pares de estereoisômeros, dentre todas as medidas físicas que podem ser realizadas na atualidade, somente a atividade óptica é capaz de distingui-los.

A obtenção de enantiômeros opticamente puros se dá basicamente através da síntese estereosseletiva e resolução da mistura racêmica por cromatografia líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral. Os fármacos que são comercializados como enantiômero puro obtidos pela rota de síntese enantiosseletiva inevitavelmente apresentam antípoda (enantiômero aposto), mesmo que em baixa quantidade na matéria-prima e, apesar deste antípoda estar presente em quantidade baixa, ele é considerado como uma impureza.

O controle de impurezas é atualmente uma questão crucial para a indústria farmacêutica. No entanto, há pouca informação disponível na literatura sobre impurezas enantioméricas. Os antípodas presentes nas formulações farmacêuticas enantiomericamente puras também devem ser considerados como impurezas provenientes da matéria-prima ou como uma consequência do processo de racemização e, portanto, eles também devem ser separados e quantificados tanto nos fármacos quanto nas preparações farmacêuticas. Assim, há necessidade de desenvolver e validar métodos específicos e enantiosseletivos para a determinação qualitativa e/ou quantitativa dos enantiômero puro e seus antípodas.

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares são as maiores causadoras de morte no mundo, matando 17,1 milhões de pessoas por ano. Devido ao grande número de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares, optou-se trabalhar com medicamentos utilizados no tratamento destas enfermidades, onde foram selecionados os princípios ativos cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol, que pertencem à classe dos betabloqueadores e cujos enantiômeros possuem efeitos farmacológicos diferentes.

O presente trabalho justifica-se por propor metodologias para resolução dos enantiômeros de cloridrato de esmolol e dos enantiômeros do cloridrato de sotalol e seus antípodas, para quantificação dos mesmos em medicamentos, de forma rápida e pouco onerosa. Apesar de existirem artigos publicados a respeito de separação quiral de ambos princípios ativos, a maioria dos artigos apresenta informações de análises exploratórias, onde diversos princípios ativos são testados ao mesmo tempo, mas não necessariamente há separação dos enantiômeros de cada princípio ativo. Em diversos casos, apenas alguns parâmetros de separação são apresentados, não sendo possível avaliar se houve separação efetiva dos enantiômeros.

Levando-se em consideração que há uma tendência crescente na comercialização dos fármacos na forma enantiomérica pura, este projeto propõe o desenvolvimento de método em escala analítica e semi-preparativa através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase estacionária quiral e desenvolvimento de método através de eletroforese capilar para a quantificação dos enantiômeros dos princípios ativos cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol em medicamentos. Através do método desenvolvido por CLAE-FEQ em escala semi-preparativa serão coletadas as frações dos enantiômeros para serem caracterizadas e utilizadas como padrões de referência nas validações dos métodos analíticos desenvolvidos.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Quiralidade e enantiômeros

A origem da estereoquímica encontra-se no início do século XIX, com estudos de diversos cientistas sobre difração, interferência e polarização da luz (WAINER, 1993). A atividade óptica foi descoberta em 1812, no Collège de France, pelo físico Jean-Baptiste Biot, que propôs que a rotação do plano de luz polarizada por um cristal de quartzo dependia da direção em que o cristal era visto, enquanto que em materiais orgânicos, moléculas individuais eram envolvidas na rotação (FASSIHI, 1993; WAINER, 1993).

Mitscherlich, em 1819, postulou a lei de isomorfismo, onde correlacionou a semelhança de formas de cristais com a equivalência estequiométrica na composição química. Em 1844, Mitscherlich publicou uma nota afirmando que os sais duplos de tartarato e paratartarato de sódio e amônio eram completamente isomórficos e idênticos em todos os aspectos, exceto na atividade óptica (FASSIHI, 1993; MASON, 1987; MASON, 1988). Observações sobre a relação entre morfologia e atividade óptica de cristais de quartzo foram realizadas por Herschel em 1822. Fresnel, em 1824, supôs que as moléculas que constituem o meio possuem um formato ou arranjo helicoidal para a esquerda ou para a direita.

A publicação de Mitscherlich feita em 1844 atraiu a atenção do químico e biólogo francês Louis Pasteur, que com base em observações feitas por Herschel e Fresnel, conseguiu, em 1848, resolver o aparente paradoxo relatado por Mitscherlich sobre os sais de sódio e amônio do (+)-ácido tartárico e do ácido racêmico ou paratartárico. Pasteur repetiu a cristalização do sal racêmico e obteve dois conjuntos de cristais hemihédricos, relacionados morfologicamente como formas espelhadas não sobreponíveis, onde um conjunto provou ser exatamente isomórfico com os cristais do correspondente natural (+)-tartarato, e possuíam rotação óptica específica idêntica quando em solução. O outro conjunto possuía além das facetas de cristal enantiomórficas, uma rotação óptica específica de mesma magnitude, mas oposta em sinal. Com base no princípio morfológico estabelecido por Haüy (1809) de que o cristal e suas moléculas constituintes são imagens uma da outra de uma forma geral

(WAINER, 1993), Pasteur propôs que as moléculas de (+) e (-) ácido tartárico eram estereoquimicamente dissimétricas, e relacionou-as como imagens espelhadas não sobreponíveis, como os cristais macroscópicos dos correspondentes sais de sódio e amônio (FASSIHI, 1993; MANCHESTER, 1995; MASON, 1987; WAINER, 1993).

Apesar de a primeira descrição dos cristais de ácido tartárico terem sido feitas por De la Provostaye em 1841 e a relação entre o cristal e sua rotação óptica em solução aquosa terem sido estabelecidas por Pasteur em 1849, a estrutura absoluta dos cristais de ácido tartárico foram determinadas apenas em 1972 por Hope e de la Camp (MUCHA et al., 1997).

Substâncias com a mesma composição química elementar, mas com diferentes propriedades físicas foram um problema para os químicos até que a teoria da estrutura molecular de que o átomo de carbono era tetravalente foi desenvolvida por Kekule em 1858. Somente em 1874 a compreensão da geometria tridimensional associada ao isomerismo foi proposta de forma independente por Van't Hoff e Le Bel, onde eles apresentaram a teoria estereoquímica de isomerismo baseada no conceito de que o carbono e outros átomos possuíam quatro valências e que, com quatro grupos diferentes associados, era possível haver duas formas não sobreponíveis centradas em torno de um átomo assimétrico. Esse átomo assimétrico seria então o que levaria à atividade óptica da molécula (DIAS, 2009; FASSIHI, 1993; WAINER, 1993).

Ao longo dos anos seguintes muitos pesquisadores tentaram compreender a importância de tais descobertas, mas foi com a teoria "chave e fechadura" de Fischer (1894) que se sugeriu que as moléculas deveriam encaixar-se em um determinado espaço geométrico, permitindo o entendimento de estereoespecificidade da ação biológica e do conceito de receptores (FASSIHI, 1993). Esta teoria foi um pouco alterada por Rosanoff (1906) e discutida por Hudson (1949) (SMIRNOVA et al., 2012).

4.2. A importância da quiralidade na área farmacêutica

Foi necessário cerca de um século para se descobrir que a quiralidade desempenha um papel fundamental não só na vida de plantas e animais, mas também nas indústrias farmacêutica, agrícola e química. Todas as proteínas, enzimas, aminoácidos, carboidratos, nucleosídeos e uma série de alcalóides e hormônios são compostos quirais. Burke e Henderson (2002) explicam que estamos sob influência constante da quiralidade durante toda a evolução, como resultado da natureza assimétrica do ambiente. Na indústria farmacêutica, mais de metade dos medicamentos atualmente em uso são produtos quirais, sendo sua grande maioria comercializada na forma de racemato. A síntese química de compostos biologicamente ativos com um centro estereogênico geralmente produz uma mistura de estereoisômeros, como enantiômeros e diastereoisômeros. Em contraste aos produtos quirais artificiais, todos os compostos naturais estão sob forma enantiomérica única (BURKE, 2002; FASSIHI, 1993; KASAI et al., 2005; NGUYEN et al., 2006; SCRIBA, 2013; TSILOUPI et al., 2013; VENTURINI et al., 2008).

O organismo, com toda a sua complexidade e seus inúmeros compostos homoquirais é seletivo quiralmente, pois interage com fármacos racêmicos de forma diferente. Ele metaboliza cada enantiômero por um caminho separado e gera atividades farmacológicas diferentes. Desta maneira, mecanismos biológicos como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco são atingidos pela estereosseletividade (FASSIHI, 1993; NGUYEN et al., 2006; SILVA et al., 2009, SCRIBA, 2013).

Easson e Stedman (1933), ao compararem a atividade farmacológica de enantiômeros contendo um único centro de assimetria, conseguiram adiantar um modelo de três pontos de fixação para explicar a seletividade farmacológica observada, podendo propôr o mecanismo de reconhecimento quiral, onde ocorrem interações entre três pontos do fármaco com o seu sítio receptor, gerando o seu reconhecimento. Assim como exibido na Figura 1, um enantiômero terá encaixe perfeito, como uma chave em sua fechadura, e o outro enantiômero terá um encaixe fraco ou não se encaixará neste receptor podendo, porém, caber em receptores de

outras partes do corpo e causar um eventual efeito indesejado ou tóxico (AHUJA, 1991; FASSIHI, 1993; NGUYEN et al., 2006).

Figura 1 – Ligação do enantiômero ao receptor, baseado no modelo de três pontos de interação (adaptado) (McCONALTHY, 2003)

Os enantiômeros de um fármaco quiral também podem variar em suas interações em função dos ambientes quirais no organismo aos quais são expostos, tais como enzimas, proteínas, receptores, etc. Estas variações podem levar a diferenças nas atividades biológicas, tais como na ação farmacológica, farmacocinética, metabolismo, toxicidade, resposta imune, entre outros. Na verdade, os sistemas biológicos podem reconhecer os dois enantiômeros como duas substâncias diferentes e sua interação, portanto, pode gerar respostas diferentes (FANG et al., 2013; NGUYEN et al., 2006; SILVA et al., 2009; YOUNES et al., 2011b). Medicamentos administrados como racematos podem ter efeitos adversos graves devido à atividade do distômero, ou seja, do enantiômero que não possui atividade terapêutica. No melhor caso, o distômero não possui nenhuma atividade, mas em muitos casos, ele impede a atividade total do eutômero (enantiômero terapeuticamente ativo), bem como pode exercer um efeito antagonista ou mesmo tóxico quando exposto a ambientes quirais. Vale ressaltar que enantiômeros podem resultar em toxicidade estereosseletiva, podendo o efeito tóxico residir tanto no enantiômero farmacologicamente ativo quanto no inativo e em um par de enantiômeros podem ser idênticos ou totalmente diferentes. Apesar de se saber das diferenças fisiológicas que enantiômeros podem possuir, nem sempre é possível

estudá-las devido principalmente à ausência dos enantiômeros puros isolados (ATES et al., 2008; BONATO et al., 2005; NGUYEN et al., 2006).

Na área farmacológica, as atividades dos fármacos racêmicos podem ser divididas em três grupos principais. O primeiro grupo é composto pela maioria dos produtos farmacêuticos racêmicos. Este grupo compreende os fármacos que possuem um enantiômero bioativo majoritário (eutômero) e outro que é inativo, menos ativo (distômero), que é tóxico ou que pode exercer outras propriedades farmacológicas desejadas ou indesejadas. Neste grupo encontram-se diversos fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares. O segundo grupo é destinado aos fármacos onde os dois enantiômeros são igualmente ativos e possuem a mesma farmacodinâmica. Poucos ativos pertencem a este grupo, e entre eles estão: ciclofosfamida (antineoplásico), flecainida (antiarrítmico) e fluoxetina (antidepressivo). O terceiro e último grupo é composto por fármacos racêmicos com apenas um eutômero, mas cujo distômero pode ser transformado no corpo em seu antípoda bioativo por inversão quiral (NGUYEN et al., 2006).

Um exemplo clássico da importância da quiralidade é o caso da talidomida (SILVA et al., 2009), medicamento utilizado na década de 50 para aliviar náuseas matinais em gestantes e que foi retirado do mercado na década de 60 devido a relatos de teratogenicidade e focomelia associados ao seu uso (ERIKSSON et al., 2001; HIDESHIMA et al., 2000; SOLOMONS, 2001). Estudos posteriores confirmaram que apenas o R-enantiômero possuía a atividade sedativa desejada, enquanto que o S-enantiômero apresentava propriedades teratogênicas, levando a deformações congênitas em fetos, quando administrado em gestantes. Outros estudos também mostraram que a talidomida sofre inversão da configuração não apenas *in vitro*, mas também *in vivo*, evidenciando que mesmo que apenas o enantiômero com propriedades sedativas e hipnóticas fosse administrado, ainda assim ele seria parcialmente convertido no enantiômero causador do efeito teratogênico. Isso fez com que seu uso devesse ser restrito (BONATO et al., 2005; ERIKSSON et al., 1995; SILVA et al., 2009; SOLOMONS, 2001).

A justificativa para que sejam desenvolvidos métodos analíticos para análises quali e quantitativa de enantiômeros não se baseia apenas em termos de controle de qualidade e processo de produção de medicamentos. É igualmente importante que sejam realizadas avaliações de absorção, distribuição, biotransformação e

eliminação dos enantiômeros, itens que constituem o perfil farmacocinético do fármaco quiral.

4.3. Impurezas enantioméricas

Levando em consideração os fatores anteriormente mencionados, os compostos enantioméricos que se destinam à comercialização em medicamentos passaram a ter exigências por parte das autoridades regulatórias de que fosse considerada a presença do outro enantiômero, fosse ele presente na matéria-prima ou no produto acabado, seguindo os mesmos princípios de qualquer impureza química (EKElund et al., 1995). O controle de impurezas farmacêuticas é atualmente uma questão crucial para a indústria farmacêutica, pois a segurança de um medicamento é dependente das propriedades toxicológicas do princípio ativo propriamente dito, bem como das impurezas que ele contém (BASAK et al., 2007). De acordo com a RDC nº 57, de novembro de 2009, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as diretrizes do *International Conference on Harmonization* (ICH) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2006b), uma impureza é definida como qualquer componente não desejável presente no intermediário ou no insumo farmacêutico ativo e como qualquer componente de um medicamento que não seja o princípio ativo ou excipiente da formulação. Desta forma, a identificação, quantificação e o controle de impurezas em fármacos e medicamentos são uma parte importante no desenvolvimento de medicamentos e assuntos regulatórios (BASAK et al., 2007), pois as mesmas podem interferir na qualidade dos mesmos.

As impurezas podem ser classificadas de diversas formas, sendo que sua origem e quantidade formada são regidas por fatores diversos (BASAK et al., 2007). Com base nas diretrizes do ICH, as impurezas podem ser classificadas como impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e solventes residuais, porém enantiômeros, polimorfos e contaminantes extrínsecos não são abrangidos na classificação acima mencionada (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2006a).

Segundo a disposição espacial de um enantiômero, um fármaco pode antagonizar ou sincronizar a ação de seu antípoda, apresentar um efeito terapêutico e o outro ser responsável por um efeito secundário, ou ainda os dois apresentarem a mesma atividade. Fatores como a liberação do fármaco no organismo também podem ser afetados quando o medicamento utiliza racematos ou enantiômeros puros. Normalmente enantiômeros puros possuem maior solubilidade e, assim, possuem uma maior taxa de dissolução e melhoram a biodisponibilidade do fármaco no organismo (REDDY, 2004).

A separação, identificação e, em muitos casos, a quantificação das impurezas enantioméricas se torna relevante para garantir a segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos (LIMA, 1997). Os antípodas presentes nas formulações farmacêuticas enantiomericamente puras também devem ser considerados como impurezas provenientes da matéria-prima ou uma consequência do processo de racemização e, assim, devem ser separados e quantificados, tanto nos fármacos, quanto nas preparações farmacêuticas.

4.4. Nomenclatura

Existem diversos sistemas de classificação para os isômeros, sendo a designação *cis* e *trans* uma das mais conhecidas. Em relação aos estereoisômeros, há três sistemas principais de nomenclatura que são baseados em princípios de classificação diferentes (BURKE, 2002; CALDWELL, 2001), enquanto que os enantiômeros de um fármaco quiral são mais bem identificados com base em sua configuração absoluta ou sua rotação óptica (McCONALTHY, 2003).

O primeiro sistema foi criado por Emile Fischer em 1919. Este sistema utiliza as designações “D” e “L” e baseia-se na estrutura da molécula em relação à molécula de referência gliceraldeído. O (+)-gliceraldeído é identificado como D-(+)-gliceraldeído, enquanto que o (-)-gliceraldeído é identificado como L-(-)-gliceraldeído. Apesar disso, as designações “D” e “L” não estão necessariamente relacionadas ao sentido de rotação óptica dos compostos, sendo possível encontrar compostos que sejam D-(+), D-(-), L-(+) ou L-(-) (BURKE, 2002; CALDWELL, 2001; SOLOMONS,

2001). Para determinar a configuração, a molécula sob investigação deve ser quimicamente convertida em gliceraldeído ou alguma outra molécula cuja configuração seja conhecida. Uma vez realizada esta etapa, a rotação é determinada e então se estabelece a configuração da molécula (WAINER, 1993). O D-gliceraldeído foi selecionado como padrão relativo, uma vez que é a molécula mais simples dos açúcares e corresponde a um dos átomos assimétricos de carbono no que diz respeito ao açúcar mais importante, a glicose, em termos de configuração (SMIRNOVA et al., 2012). Esta convenção normalmente é inexata e difícil de ser utilizada por ser necessário converter a molécula em análise em uma molécula cuja configuração seja conhecida (WAINER, 1993). Esta nomenclatura é normalmente utilizada para açúcares e aminoácidos e são específicas para estas moléculas e geralmente não são aplicáveis a outros compostos (McCONALTHY, 2003).

O segundo sistema é baseado na rotação óptica dos compostos e utiliza os termos (+) e (-) para compostos dextrógiros e levógiros, respectivamente, além de ($\pm$) para racematos. Um composto dextrógiro possui rotação no sentido horário do plano de luz polarizada, enquanto que um composto levógiro possui rotação no sentido anti-horário. Os termos “d” e “l” para compostos dextrógiros e levógiros possuem o mesmo princípio que o sistema (+) e (-), porém são considerados obsoletos e devem ser evitados (CALDWELL, 2001; McCONALTHY, 2003).

O último sistema utiliza a configuração absoluta da molécula, sendo a configuração absoluta do centro quiral designada como R ou S para descrever de forma inequívoca a estrutura tridimensional da molécula. A designação R vem do latim *rectus* e significa para a direita, e S vem do Latim *sinister* e significa para a esquerda. Há regras precisas com base no número atômico e massa para determinar se um determinado centro quiral possui configuração R ou S. Os substituintes do centro quiral são ordenados de acordo com seu número atômico, sendo organizados do maior para o menor. A molécula então é orientada de modo que o menor dos quatro substituintes seja direcionado para longe do observador. A configuração é então determinada conforme o sentido em que os substituintes maior, médio e menor são rotacionados (sentido horário ou anti-horário). Caso a molécula gire no sentido horário, ela será designada de R e, caso ela gire no sentido anti-horário, será designada de S (BURKE, 2002; WAINER, 1993). Este método de denominação é chamado de sistema Cahn-Ingold-Prelog e é o sistema atualmente

utilizado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (REDDY, 2004; SOLOMONS, 2001).

No caso dos fármacos e moléculas que possuem mais de um centro quiral, é necessário atribuir uma configuração absoluta para cada centro quiral. A rotação óptica é frequentemente usada por ser mais fácil de ser determinada experimentalmente do que a configuração absoluta, mas ela não fornece informações sobre a configuração absoluta de um enantiômero. Para um dado par enantiomérico, um enantiômero pode ser designado como (+) e o outro como (-), com base na direção que os mesmos giram a luz polarizada. A rotação óptica também tem sido descrita como dextrógira para (+) e levógira para (-). Racematos podem ser designados como (R, S) ou ($\pm$) (McCONALTHY, 2003).

Devido à semelhança nas estruturas e, portanto, nas propriedades dos pares de estereoisômeros, dentre todas as medidas físicas que podem ser realizadas na atualidade, a atividade óptica é a única capaz de distingui-las (ALTRIA, 1996b; YOUNES et al., 2011b). Atualmente, a grande maioria das determinações de impurezas relacionadas a fármacos são realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que pode oferecer a sensibilidade desejada para rastrear traços de impurezas e oferece um alto grau de automação. É prática comum empregar uma técnica analítica secundária para verificar os dados obtidos por CLAE. No passado, esse teste secundário era amplamente realizado por cromatografia em camada delgada (CCD), porém a disponibilidade de sistemas de eletroforese capilar (CE, do inglês, *capillary electrophoresis*) apresentou ao setor farmacêutico uma alternativa analítica nova e viável à cromatografia líquida de alta eficiência e à CCD, pois estes equipamentos possuem sensibilidade e precisão necessária que se aproxima à da CLAE (ALTRIA, 1996b). Na terapêutica clínica, o uso de ensaios quirais ainda não é universalmente realizado, apesar de haver conhecimento de que a realização de determinações não-estereosseletivas de um fármaco administrado como um racemato pode resultar em interpretação terapêutica errônea (NGUYEN et al., 2006).

4.5. Separação quiral

No decorrer das últimas três décadas, houve um aumento do conhecimento da atividade biológica dos enantiômeros devido aos avanços em relação à síntese, análise e separação de moléculas quirais. Como resultado dos avanços tecnológicos e da potencial vantagem da administração de enantiômeros puros, diversos encontros científicos foram realizados no final de década de 80 e início da década de 90 com o intuito de discutir sobre novas tecnologias e a significância da quiralidade nas áreas de farmacologia e terapêutica (HUTT, 2003).

O desenvolvimento de fármacos quirais passou a ter importância concreta quando, em 1992, o FDA publicou uma declaração de política para o desenvolvimento de novos fármacos estereoisoméricos, que também foi seguida por outras agências regulatórias, como a Comunidade Europeia e o do Japão. As autoridades regulatórias exigem atualmente que sejam realizados estudos pré-clínicos para os enantiômeros isoladamente para que seja possível registrar novos fármacos quirais, além de exigir que as propriedades cinéticas e dinâmicas sejam estabelecidas (BOJARSKI, 2002).

Apesar de órgãos regulatórios exigirem testes em relação ao desenvolvimento de medicamentos utilizando enantiômeros puros e racematos, a decisão relativa à forma estereoisomérica a ser utilizada/comercializada nos medicamentos cabe à empresa que irá fabricá-lo. No entanto, tal decisão exige uma justificativa científica, baseada em qualidade, segurança e eficácia, juntamente com uma avaliação de seus riscos e benefícios (HUTT, 2003). Como resultado das exigências feitas por parte das agências regulatórias, o número de submissões enviadas para aprovação de novas entidades químicas quirais como estereoisômeros puros, em vez de misturas racêmicas aumentou nos últimos 10 anos. Entretanto, uma certa quantidade de fármacos comercializados previamente como racematos, foram reavaliados e passaram a ser comercializados como enantiômeros puros. Como resultado, alguns medicamentos estão disponíveis para comercialização tanto na forma de enantiômero puro quanto na forma de racemato em países diferentes. Obviamente, é importante que profissionais da área da saúde estejam cientes de

que os estereoisômeros puros e sua mistura racêmica podem possuir méritos relativos em relação ao seu uso.

No Brasil, desde 2003 há resoluções tratando sobre o desenvolvimento de novos fármacos estereoisoméricos. De acordo com a RDC nº 135, de 29 de maio de 2003, para o registro de medicamentos genéricos, devem ser enviados dados sobre os teores de estereoisômeros, no caso de fármacos que apresentam quiralidade cuja proporção possa afetar a segurança e eficácia do medicamento. Além da RDC nº 135, existe a RDC nº 136, também de 29 de maio de 2003 onde, dentre as informações técnicas do princípio ativo a serem enviadas para a ANVISA, deve-se relatar a presença de possíveis enantiômeros (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003a; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003b). Porém, com o surgimento da RDC nº 57, de 18 de novembro de 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2009) passou a exigir a caracterização e quantificação de isômeros para o registro de insumos farmacêuticos ativos que possuam quiralidade, criando uma demanda crescente para métodos rápidos, precisos e sensíveis para a determinação da pureza enantiomérica.

A separação quiral, também chamada de resolução quiral, é um dos procedimentos usados para separar os dois isômeros de compostos racêmicos na indústria farmacêutica, bem como em análises clínicas. Durante a síntese química, muitos medicamentos podem ser racemizados *in situ* por uma variedade de reações químicas, mesmo que o procedimento tenha iniciado com reagentes enantiomericamente puros (NGUYEN et al., 2006). Outra abordagem utilizada é a resolução enzimática ou cinética, onde microorganismos (por exemplo, leveduras, fungos, bactérias) degradam um dos dois isômeros de um racemato por assimilação enzimática, e o isômero que não é digerido permanece em solução, sendo então isolado. Este método, porém, apresenta como desvantagem o fato de uma das formas enantioméricas ser destruída (COFFEN, 1997; NGUYEN et al., 2006). No caso dos fármacos que já são comercializados como racematos, há uma tendência pela utilização da técnica denominada *chiral switch* ou *racemic switch*, que é um procedimento para transformar um fármaco racêmico em seu único enantiômero ativo. Este desenvolvimento do enantiômero puro feito pela indústria farmacêutica possuirá uma proteção patentária adicional e um novo nome genérico (AHUJA,

1997; COFFEN, 1997; HUTT, 2003; MAIER et al., 2001; NGUYEN et al., 2006; SCRIBA, 2013; VENTURINI et al., 2008; YOUNES et al., 2011a; YOUNES et al., 2011b).

Técnicas como CCD, cromatografia gasosa, CLAE, cromatografia de fluido supercrítico e CE podem ser utilizados para realizar separação cromatográfica de enantiômeros (AHUJA, 1997; NGUYEN et al., 2006; SCRIBA, 2013; VENTURINI et al., 2008; YOUNES et al., 2011a; YOUNES et al., 2011b).

4.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os métodos convencionais utilizados para medir a atividade óptica são de fato ópticos, e incluem polarimetria, dispersão óptica rotatória e dicroísmo circular (LOCHMÜLLER, 1975). O método clássico para a determinação da pureza óptica, constante em monografias farmacopéicas de substâncias farmacêuticas, é a rotação óptica. No entanto, este método não possui exatidão e precisão desejada, e torna difícil controlar o teor de impureza enantiomérica, principalmente quando esta se apresenta em baixas concentrações (EKELUND et al., 1995). Métodos cromatográficos como CCD, cromatografia gasosa e CLAE oferecem diferentes vantagens sobre as técnicas clássicas de separação e análise de estereoisômeros, especialmente os enantiômeros. Estes métodos são promissores para separação, em média escala, de intermediários sintéticos e produtos finais (AHUJA, 1997). Nos últimos anos, a técnica de CLAE, que é capaz de separar e determinar enantiômeros, foi grandemente aprimorada (EKELUND et al., 1995; SCRIBA, 2031; TSIOUPI et al., 2013).

A CLAE é a técnica mais utilizada na determinação do excesso ou pureza enantiomérica de matéria-prima e de formulações farmacêuticas comercializadas como enantiômeros puros. Os enantiômeros podem ser resolvidos tanto pelo método indireto quanto pelo método direto de separação. Utilizam-se seletores quirais como aditivos quirais na fase móvel ou fase estacionária quiral. Pode-se ainda realizar derivatização da amostra utilizando um reagente quiral para produzir moléculas diastereoméricas que podem então ser separadas por métodos cromatográficos

aquirais (AHUJA, 1997; BONATO et al., 2005; NGUYEN et al., 2006; PETERSEN et al., 1997; SCRIBA, 2013). Estes dois métodos de separação serão explicados a seguir.

4.5.1.1. Método indireto

No método indireto, a derivação dos enantiômeros com um reagente quiral e enantiomericamente puro conduz à formação de um par de diastereoisômeros que apresentam propriedades físico-químicas diferentes (AHUJA, 1991; NGUYEN et al., 2006; TANG et al., 2004). Estes dois diastereoisômeros obtidos podem ser separados por cristalização ou por filtração se um for solúvel e o outro insolúvel e, posteriormente, o sal é decomposto por tratamento com ácido ou base, e então o enantiômero puro é obtido. Os dois diastereoisômeros formados também podem ser separados por cromatografia líquida clássica aquiral (NGUYEN et al., 2006). Ao contrário das separações não quirais, o uso principal da derivatização quiral serve para melhorar a separação e não para melhorar a detecção (SNYDER et al., 1997).

A utilização de diastereoisômeros é a técnica cromatográfica mais antiga de realizar a resolução de enantiômeros. A derivatização do soluto da molécula opticamente ativa com outra molécula opticamente ativa depende da capacidade de derivatizar a molécula alvo antes de realizar a separação da mesma em coluna cromatográfica, pois é necessário que o analito possua um grupo funcional (por exemplo, amina, hidroxila, carbonila, entre outros) que possa reagir com o reagente derivatizante quiral (AHUJA, 1997). Além disso, a necessidade de reagentes opticamente puros, o tempo demasiadamente longo atribuído à reação de derivatização, a possibilidade de racemização do reagente durante a formação dos diastereoisômeros ou seu armazenamento, a variação no rendimento da formação dos diastereoisômeros e a necessidade de um tratamento químico posterior para a recuperação dos enantiômeros são desvantagens apresentadas pelo método (MAIER et al., 2001).

O método indireto raramente é utilizado na indústria por causa de suas limitações, o que faz com que separações quirais diretas usando fases estacionárias

quirais sejam as mais utilizadas devido à sua simplicidade e rapidez. Por outro lado, a CLAE indireta é frequentemente realizada em análises biológicas por causa de sua alta sensibilidade (NGUYEN et al., 2006).

Apesar de o método indireto possuir diversas desvantagens, há situações em que seu uso é desejável. Ele pode ser útil em casos onde, por exemplo, a molécula original não possui grupamento cromóforo e a reação com um reagente derivatizante quiral possa introduzir um grupamento cromóforo ou em casos em que se utilize fase estacionária quiral (FEQ), mas que seja necessário realizar derivatização para que haja reconhecimento quiral ou para que os analitos apresentem comportamento cromatográfico adequado (WAINER, 1993).

4.5.1.2. Método direto

O método direto utiliza um seletor quiral, seja na fase estacionária quiral (FEQ) ou com aditivos quirais na fase móvel. Separações quirais diretas usando FEQs são amplamente utilizadas e são mais previsíveis em termos mecanicistas do que aqueles que utilizam aditivos quirais na fase móvel (NGUYEN et al., 2006). O método que utiliza FEQ fundamenta-se na diferença de estabilidade dos complexos diastereoisoméricos formados entre os enantiômeros e a FEQ, devido às diferentes forças de atração ou repulsão de interação simultânea, sendo que quanto maior for a diferença, maior será a separação. As vantagens desse procedimento são as análises cromatográficas rápidas, recuperação dos enantiômeros com relativa facilidade, existência de várias colunas quirais disponíveis comercialmente e dispensável derivatização preliminar do soluto, a não ser quando da utilização para melhorar as características de detecção se presentes em matrizes complexas (AHUJA, 1997; FRANCOTTE, 2001). Esta técnica tem sido amplamente utilizada na determinação da pureza óptica e constituição isomérica de medicamentos, matérias-primas e fluidos biológicos.

O método que utiliza aditivos quirais raramente é utilizado devido aos problemas que lhe são inerentes, como a necessidade de haver fornecimento constante do mesmo e seu alto custo. As abordagens principais para formar

complexos diastereoméricos utilizando aditivos quirais são: formação de complexos com íons de metais de transição (troca de ligantes), pareamento iônico e formação de complexos de inclusão (como, por exemplo, ciclodextrinas) (AHUJA, 1991). Além disso, seu uso é associado à baixa eficiência (formato de picos inadequado e baixo número de pratos teóricos), bem como a problemas de detecção. Quando os aditivos não são transparentes ao tipo de radiação aplicado pelo detector, a absorvidade da fase móvel aumenta e, como consequência, faz com que a sensibilidade dos analitos seja reduzida (AHUJA, 1997; SNYDER et al., 1997).

Mesmo em um método direto, os enantiômeros originais podem ou não ser derivatizados previamente por reação com um reagente quiral (SNYDER et al., 1997).

4.5.1.3. Fases estacionárias quirais

Colunas contendo fases estacionárias quirais são compostas por moléculas quirais ligadas quimicamente a um suporte como sílica, aminopropilsílica e partículas de fase estacionária quiral polimérica, sendo os dois primeiros os suportes mais comuns. A ligação química pode ser do tipo covalente, iônica ou por revestimento físico. Enantiomorfos puros, diastereoisômeros, misturas diastereoméricas e polímeros quirais (por exemplo, proteínas) podem ser utilizados como seletores quirais (WAINER, 1993). A fase estacionária quiral interage com os enantiômeros do analito para formar complexos diastereoisoméricos transitórios e de curta duração. De acordo com relatos de Aboul-Enein e colaboradores (ABOUL-ENEIN, 2003), todos os seletores quirais proporcionam uma superfície quiral para os enantiômeros, os quais formam complexos temporários com os seletores, tendo energias de ligação diferentes. Os enantiômeros diferem em suas energias de ligação por se encaixarem de forma diferente nas estruturas dos seletores quirais e, consequentemente, os dois enantiômeros podem ser eluídos em diferentes momentos pela fase móvel e, assim, serão detectados separadamente. Em geral, o mecanismo de reconhecimento de um seletor quiral é baseado em um encaixe do tipo chave-fechadura. Este processo, apesar de parecer simples, é bastante

complexo, pois é necessário que durante a formação do complexo, o soluto e a FEQ estejam em posição espacial relativa um ao outro, conforme os tipos de interações necessárias para que o encaixe possa ocorrer (NGUYEN et al., 2006; SNYDER et al., 1997; WAINER, 1993).

A primeira FEQ disponível comercialmente foi desenvolvida pelo professor William H. Pirkle e colaboradores. Pirkle foi o pesquisador que liderou pesquisas no campo de enantioseparação cromatográfica (WELCH, 1994).

A escolha de uma coluna quiral é feita em geral examinando o mecanismo de interação entre FEQ e analito quiral. A capacidade do analito e da FEQ formarem complexos diastereoméricos transitórios utilizando pontes de hidrogênio, interações π - π , ligações dipolo, complexos de inclusão e forças estéricas determinam a separação enantiomérica (SNYDER et al., 1997). Pirkle propôs que para um enantiômero ser resolvido, pelo menos três interações simultâneas deveriam ocorrer, sendo pelo menos uma delas estereoquimicamente dependente (SNYDER et al., 1997).

Inicialmente, considerava-se que apenas as interações atrativas eram responsáveis pela discriminação quiral. Atualmente, porém, é aceito que as interações repulsivas também participam do mecanismo de resolução enantiomérica. Os principais tipos de interações responsáveis pela discriminação entre os enantiômeros de um analito e o seletor quiral, no sentido decrescente de intensidade, são: interação coulômbica ou elétrica, ponte de hidrogênio e interação estérica (muito fortes), interação π - π e íon-dipolo (fortes), interação dipolo-dipolo (intermediária), interação dipolo-dipolo induzido (fraca) e dispersão de London ou van der Waals (muito fraca). As interações coulômbicas e do tipo π - π podem ser atrativas ou repulsivas, a interação estérica é repulsiva e as demais são todas atrativas (BERTHOD, 2006).

O reconhecimento quiral não necessariamente resulta em uma diferenciação quiral dos enantiômeros no sistema cromatográfico. A separação é baseada na enantiosseletividade termodinâmica, e a diferença de energia livre da formação de dois complexos diastereoisoméricos depende das contribuições de entalpia e entropia. Normalmente, a contribuição entálpica é dominante, já que os dois complexos diastereoisoméricos diferem no número de interações (duas ou três). Às vezes, porém, predomina a grande diferença na entropia de formação dos dois

complexos. Isso ocorre quando há diferença no número de moléculas do solvente que participam da formação dos dois complexos. Em ambos os casos, quando há predominância da entalpia ou da entropia, ocorre discriminação quiral (DAVANKOV, 1997).

As fases estacionárias quirais utilizadas em CLAE podem ser divididas em cinco categorias, baseadas nas interações entre o soluto e a FEQ. São as seguintes (AHUJA, 1991; WAINER, 1993; RIBEIRO et al., 2012):

Tipo I – os complexos formados entre soluto e FEQ são formados por forças atrativas, pontes de hidrogênio, ligações π - π , ligações dipolo, etc.;

Tipo II – o mecanismo primário para a formação do complexo entre soluto e FEQ ocorre através de forças atrativas. Complexos de inclusão também possuem papel importante em FEQ deste tipo;

Tipo III – os complexos de inclusão são formados quando o soluto entra na cavidade quiral da FEQ;

Tipo IV – o soluto é parte de um complexo metálico diastereomérico (cromatografia quiral de troca de ligante);

Tipo V – a FEQ é uma proteína e os complexos formados entre soluto e FEQ baseiam-se em combinações de interações hidrofóbicas e polares.

A utilização de FEQs de polissacarídeos e ciclodextrinas dominam a maior parte das separações por CLAE-FEQ. FEQs de proteínas, ligantes, troca iônica e antibióticos macrocíclicos também são bastante utilizadas e representam cerca de um terço de todas as separações quirais por CLAE (WARD, 2012).

Entre uma centena de FEQs disponíveis para CLAE, apenas alguns tipos de sorventes quirais a seguir indicados são atualmente os mais utilizados para CLAE em escala preparativa na indústria: carboidratos (celulose, amilose), poliacrilamida, dialiltartardiamida, fases Pirkle, fases Chirobiotic (vancomicina, teicoplanina). No entanto, não existe uma FEQ única que possa ser considerada universal, ou seja, que tenha a capacidade de separar todas as classes de compostos racêmicos. Escolher a coluna adequada para a separação enantiomérica de um composto racêmico é difícil. A decisão baseia-se principalmente em dados empíricos e experiência. Deste modo, a compreensão dos mecanismos de reconhecimento dos seletores quirais com enantiômeros pode ajudar o analista a resolver alguns problemas de resolução e economizar tempo (NGUYEN et al., 2006). Muitos fatores,

como a composição da fase móvel (pH, eletrólitos, solventes utilizados), tamanho e comprimento da coluna, temperatura, etc, podem influenciar significativamente na resolução quiral (NGUYEN et al., 2006).

As FEQs mais comumente utilizadas são descritas a seguir.

4.5.1.3.1. Fases estacionárias quirais do tipo Pirkle

As fases estacionárias quirais do tipo Pirkle também são conhecidas como FEQ do tipo *Brush* ou tipo aceitor-doador. Pirkle se baseou na teoria de que o reconhecimento quiral é um evento recíproco. Assim, se uma FEQ Y pode separar os enantiômeros de X e seus compostos relacionados, então os enantiômeros de X podem funcionar como uma FEQ para resolver os enantiômeros de Y e seus compostos relacionados (SNYDER et al., 1997). As fases do tipo Pirkle são derivativas de aminoácidos que possuem entidades aromáticas. Um seletor quiral de baixo peso molecular é ligado a um substrato de sílica ou zircônia, e as moléculas do seletor quiral são distribuídas uniformemente sobre o substrato (THOMPSON, 2005). De acordo com a classificação proposta por Wainer, estas FEQs se enquadram na categoria tipo I.

As colunas do tipo Pirkle são capazes de separar enantiômeros baseado na ligação preferencial de um dos enantiômeros à FEQ através de ligações π - π , pontes de hidrogênio, interações estéricas e/ou ligações dipolo. Três ou mais interações intermoleculares são necessárias, sendo que duas interações precisam ser atrativas, enquanto que a terceira interação pode ser estérica, seja atrativa ou repulsiva (AHUJA, 1991; LINDNER, 1987; SNYDER et al., 1997).

Há três tipos de colunas Pirkle. O primeiro tipo é chamado de aceitor de elétrons π e normalmente são efetivos para separar enantiômeros aromáticos que são considerados bons doadores de elétrons π . Entre as desvantagens apresentadas por este tipo de coluna é que elas apenas funcionarão com compostos aromáticos e que derivatização pode ser necessária para ajudar na separação dos enantiômeros. Contudo, a derivatização é aquiral e assim não apresentam os problemas envolvidos na derivatização quiral. O segundo tipo contém espécies

doadoras de elétrons π na FEQ. O terceiro tipo é híbrido, onde a FEQ é do tipo aceptora-doadora de elétrons π (por exemplo, coluna Whelk-O 1). As fases são mais frequentemente utilizadas no modo normal para aumentar a quantidade de ligações π - π e pontes de hidrogênio (THOMPSON, 2005).

Uma das vantagens das colunas do tipo Pirkle é que muitas estão disponíveis em ambas as formas enantioméricas, permitindo reverter a ordem de eluição dos enantiômeros, o que é muito útil para realizar separações em escala analítica e em escala preparativa (SNYDER et al., 1997).

4.5.1.3.2. Fases estacionárias quirais derivadas de polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros de condensação de carboidratos. A amilose e a celulose são polímeros com atividade óptica de maior ocorrência na natureza, não sendo, entretanto, muito úteis para o preparo de FEQs por apresentarem pouca resistência mecânica e limitada capacidade de resolução quiral (YASHIMA, 2001). Contudo, a derivação desses polissacarídeos em acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamatos conduz à formação de novos sítios de reconhecimento quiral para a separação dos enantiômeros de uma variedade de compostos racêmicos, melhorando assim, as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas (OKAMOTO, 1994).

As FEQs derivadas de amilose e celulose pertencem à classe tipo II, conforme a classificação proposta por Wainer (SUBRAMANIAN, 1994). Estas FEQs apresentam vasta aplicabilidade e são capazes de resolver um grande e variado número de compostos quirais. Além disso, são muito flexíveis, já que podem ser usadas tanto em fase normal quanto em fase reversa, em diferentes modos (OKAMOTO, 1994; THOMPSON, 2005). Na Tabela 1 pode-se verificar a estrutura química de algumas FEQs derivadas de amilose e celulose produzidas, inicialmente, pela Daicel Chemical Industries Ltd. (Tóquio, Japão) e hoje, pela Chiraltech Technologies Inc.

Tabela 1 - Estrutura química de FEQs derivadas de amilose e celulose (THOMPSON, 2005)

Estrutura química	R	Seletor quiral	Nome comercial
CH ₃	Triacetato de celulose
	Tribenzoato de celulose	Chiralcel OB Chiralcel OB-H
	Tris(4-metilbenzoato) de celulose	Chiralcel OJ Chiralcel OJ-H Chiralcel OJ-RH
	Tris(4-metilfenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OG
	Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	Chiralpak IB-H Chiralcel OD Chiralcel OD-H Chiralcel OD-R Chiralcel OD-RH
	Tris(4-clorofenilcarbamato) de celulose	Chiralcel OF
	Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	Chiralpak IA-H Chiralpak AD Chiralpak AD-H Chiralpak AD-RH
Tris[(S)-fenilcarbamato] de amilose	Chiralpak AS Chiralpak AS-H Chiralpak AS-RH

O reconhecimento quiral nas FEQs baseadas em derivados de polissacarídeos, apesar de ainda não ter sido completamente elucidado (SNYDER et al., 1997), é atribuído à formação de complexos de inclusão, aliada a interações adicionais (pontes de hidrogênio, interações dipolo, ligações π - π e forças de Van der Waals) que dependem do modo cromatográfico utilizado (THOMPSON, 2005). A capacidade de discriminação quiral dos derivados de amilose é totalmente distinta dos correspondentes derivados de celulose, podendo-se observar em alguns casos, a inversão da ordem de eluição dos enantiômeros (MAIER et al., 2001). Além da variação em função do polissacarídeo, a enantiosseletividade dessas FEQs pode ser influenciada pelo composto utilizado na derivatização, pelos componentes da fase móvel, temperatura e modo cromatográfico (THOMPSON, 2005).

Em fase normal, o reconhecimento quiral ocorre pelo encaixe estérico em cavidades quirais, com contribuições de pontes de hidrogênio, interações dipolo e ligações π - π . O modificador orgânico pode alterar a enantiosseletividade do método. Solventes apróticos podem melhorar a resolução em situações onde pontes de hidrogênio favorecem o reconhecimento quiral. Já no caso da utilização destas FEQs em fase reversa, o mecanismo quiral predominante é a inclusão forma-dependente em cavidades quirais e conforme os eluentes utilizados, interações secundárias são mais fracas do que quando em modo normal (THOMPSON, 2005).

4.5.1.3.3. Fases estacionárias quirais derivadas de ciclodextrinas

A ciclodextrina (CD) foi descoberta em 1891 por Villiers Schardinger, que isolou o bacilo *B. macerans*, que é responsável pela formação da ciclodextrina a partir de amido (AHUJA, 1991). As ciclodextrinas são oligossacarídeos formados por seis, sete ou oito unidades de glicopirranose unidas por ligações nas posições α -1,4-glicosídicas para formar um anel. Essa estrutura possui forma toroidal assimétrica ou de um cone truncado (AHUJA, 1991; BONATO et al., 2005; MIRANDA et al., 2011; REDDY, 2004; SUBRAMANIAN, 1994; VENTURINI et al., 2008). A CD é designada como α , β ou γ , de acordo com o número de unidades de glicopirranose que as compõem (6, 7 ou 8, respectivamente), conforme exibido na Figura 2 (SNYDER et al., 1997; THOMPSON, 2005). A β -CD e seus derivados são as ciclodextrinas mais utilizadas para realizar separações enantioméricas. As ciclodextrinas pertencem às FEQs do tipo III (LIPKOWITZ, 1995).

Figura 2 – Estrutura de α , β , e γ -ciclodextrina (VENTURINI et al., 2008)

A cavidade interior da ciclodextrina é relativamente hidrofóbica. Uma variedade de compostos solúveis e insolúveis em água podem se encaixar dentro dela para formar complexos de inclusão/inserção (Figura 3). As ciclodextrinas interagem com diversos compostos através de inclusão na cavidade hidrofóbica por ligações hidrofóbicas não-covalentes, forças de van der Waals e pontes de hidrogênio. Ao contrário das fases estacionárias quirais convencionais de ciclodextrinas, as fases estacionárias quirais de ciclodextrinas derivatizadas podem ser utilizadas em modo reverso e normal (AHUJA, 1991; AHUJA, 1997; WAINER, 1993).

Figura 3 – Encaixe do soluto em cavidade de ciclodextrina (SNYDER et al., 1997)

Para ser obtida separação quiral utilizando-se ciclodextrinas, uma parte ou todas as moléculas do soluto devem entrar na cavidade da ciclodextrina. Na maioria dos casos, solutos que são resolvidos com sucesso possuem um anel aromático no centro estereogênico ou na posição adjacente ao centro estereogênico, e é a porção

aromática da molécula que é inserida na cavidade de inclusão. O tamanho do anel aromático e a cavidade da ciclodextrina irão determinar qual ciclodextrina que irá formar o melhor complexo de inclusão. Além do sistema aromático, os solutos resolvidos com sucesso por FEQ de CD possuem grupamentos para formar pontes de hidrogênio ou um sistema π adicional (grupamento carbonila ou anel aromático) no centro estereogênico da molécula (AHUJA, 1991; WAINER, 1993). Para que haja um bom encaixe e, conseqüentemente, reconhecimento quiral, a porção hidrofóbica do analito não deve ser muito menor nem muito maior que a cavidade da CD (SNYDER et al., 1997).

A utilização de CD como modificador em fase móvel é uma alternativa, pois suas propriedades únicas de complexação são vantajosas para a cromatografia e também para a eletroforese capilar. Fases móveis aquosas modificadas com tampões, como acetato de sódio, são comumente utilizados (AHUJA, 1997). Metanol e acetonitrila têm sido os modificadores orgânicos mais utilizados para realizar separação quiral em FEQ-CD no modo de fase reversa. A natureza do complexo de inclusão da CD com moléculas orgânicas é tal que normalmente é mais forte em água e diminui com a adição de modificadores orgânicos (AHUJA, 1991). Eluentes para fase normal são geralmente, mas não limitados a, misturas de hexano : isopropanol. A constante de ligação da ciclodextrina é dependente da temperatura, sendo que esta constante aumenta com a diminuição da temperatura. A redução de temperatura normalmente melhora a seletividade, mas o mesmo não pode ser dito para a resolução.

4.5.1.3.4. Fases estacionárias quirais derivadas de éteres coroa

Éteres coroa são poliéteres sintéticos macrocíclicos que podem formar complexos seletivos com diversos cátions (WAINER, 1993). Estes, ao contrário das ciclodextrinas, possuem uma cavidade hidrofílica e a superfície exterior hidrofóbica. A cavidade possui forte afinidade por cátions, principalmente por interações eletrostáticas. Assim como as ciclodextrinas, os éteres coroa também pertencem às FEQs do tipo III (LIPKOWITZ, 1995).

Os éteres coroa podem complexar cátions inorgânicos e aminas primárias protonadas no centro estereogênico ou próximo ao centro estereogênico. FEQs de éter coroa são boas para separar aminoácidos livres e O-derivatizados, peptídeos pequenos e diversos fármacos quirais que contêm aminas primárias (THOMPSON, 2005; WAINER, 1993). A interação de inclusão ocorre inicialmente pela formação de uma tripla ponte de hidrogênio entre os átomos de hidrogênio do grupamento amônio e os átomos de oxigênio do éter coroa. O mesmo complexo é formado se o analito se aproxima das extremidades do éter coroa. A introdução de grupamentos volumosos na parte exterior dos éteres coroa geram barreiras estéricas e induzem interações enantiosseletivas com o analito (THOMPSON, 2005).

As fases móveis que podem ser utilizadas limitam-se a ácido perclórico modificado com pequenas quantidades de modificadores orgânicos, mas apesar disso, a retenção e a estereosseletividade podem ser alteradas com variação de pH entre 1 e 3 e ajustes de temperatura (WAINER, 1993).

Geralmente as duas formas enantioméricas das FEQs derivadas de éter coroa estão disponíveis, permitindo controlar a ordem de eluição dos enantiômeros. Também existem colunas onde o éter coroa e seus derivados estão ligados à sílica covalentemente, permitindo maior flexibilidade no uso de solventes orgânicos na fase móvel e, assim, gera um aumento na variedade de compostos passíveis de serem separados por este tipo de FEQ (THOMPSON, 2005).

4.5.1.3.5. Fases estacionárias quirais do tipo troca de ligantes

As FEQs do tipo troca de ligantes pertencem à classe tipo IV. Elas baseiam-se na formação de complexos diastereoméricos ternários que envolvem um íon de metal de transição (M), normalmente Cu^{2+} ; um enantiômero de uma molécula quiral (L), normalmente um aminoácido; e enantiômeros do soluto racêmico (R e S). Os complexos dos quelatos diastereoméricos formados são: L-M-R e L-M-S. Quando esses complexos possuem estabilidades diferentes, o complexo menos estável é eluído primeiro, e assim os enantiômeros são separados (AHUJA, 1991; WAINER, 1993).

Amostras que são separadas por este tipo de FEQ precisam ser capazes de formar complexos de coordenação com íons de metais de transição, o que limita as classes de compostos à α -aminoácidos e α -hidroxiácidos mono e dicarboxílicos (WAINER, 1993).

São utilizadas fases aquosas que contém sulfato de cobre II, e os tempos de retenção podem ser alterados variando a concentração desta solução. Pode-se variar a retenção cromatográfica alterando pH da fase móvel, adicionando modificadores na fase móvel ou a temperatura (WAINER, 1993).

FEQs do tipo troca de ligantes são reconhecidas desde 1970, porém a pequena quantidade de moléculas que podem ser separadas restringiu o desenvolvimento de outras colunas deste tipo (SUBRAMANIAN, 1994).

4.5.1.3.6. Fases estacionárias quirais derivadas de proteínas

Proteínas são polímeros complexos de alto peso molecular que são compostos por subunidades quirais (L-aminoácidos). Estes biopolímeros exercem diferentes papéis no sistema biológico, incluindo a captação e transporte de fármacos. Um aspecto importante dos mecanismos de captação e transporte de fármaco é a ligação reversível de pequenas moléculas às proteínas e este processo normalmente é estereoespecífico (AHUJA, 1991; WAINER, 1993).

A capacidade estereoespecífica das proteínas de se ligarem a pequenas moléculas foi utilizada para desenvolver FEQs baseadas em proteínas, incluindo fases feitas com α_1 -ácido glicoproteína (AGP, que é a principal proteína plasmática na ligação a fármacos básicos), albumina sérica humana (principal proteína plasmática na ligação a fármacos fracamente ácidos), albumina sérica bovina, ovomucóide, celobiohidrolase e pepsina (SNYDER et al., 1997; SUBRAMANIAN, 1994; THOMPSON, 2005; WAINER, 1993). As FEQs desenvolvidas com estas proteínas são úteis na resolução de enantiômeros e possuem uma ampla faixa de aplicação. A α_1 -ácido glicoproteína possui destaque especial por ser a mais ampla de todas. Estas FEQs são do tipo V e, apesar de possuírem alta enantiosseletividade, têm baixa capacidade, pois pequenas quantidades dos

seletores quirais conseguem ser imobilizadas por grama de sílica. Como ferramentas analíticas, as mesmas possuem grande utilidade, porém não são aplicáveis para preparação de enantiômeros puros em larga escala (AHUJA, 1991; SUBRAMANIAN, 1994; WAINER, 1993).

Estas FEQs somente são utilizadas em fase reversa, utilizando normalmente tampão fosfato de sódio em pH 7,0. Nessas condições, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio ocorrem entre a parte proteica da FEQ e o soluto, porém interações hidrostáticas também podem ocorrer. O mecanismo de reconhecimento quiral ainda não está bem elucidado, mas sabe-se que interações de ligação entre o soluto e a proteína normalmente envolvem mecanismos estereoespecíficos e não-estereoespecíficos. Estes mecanismos tornam as FEQs deste grupo sensíveis a composição da fase móvel, temperatura, vazão e pH (AHUJA, 1991; SNYDER et al., 1997; SUBRAMANIAN, 1994; THOMPSON, 2005; WAINER, 1993).

Essas fases apresentam enantiosseletividade para um grande número de compostos, permitindo análise direta, ou seja, sem necessidade de derivatização. Por outro lado, a baixa capacidade e menor estabilidade das colunas e o limitado entendimento dos mecanismos de separação são fatores limitantes para seu uso (BONATO et al., 2005).

4.5.1.3.7. Fases estacionárias quirais derivadas de antibióticos glicopeptídicos

Há três antibióticos macrocíclicos que vêm sendo bastante utilizados como seletores quirais que estão disponíveis como FEQ: ristocetina A, vancomicina e teicoplanina. Elas possuem características que permitem que interajam com compostos quirais de maneira enantiosseletiva, como múltiplos centros quirais e diversos grupos funcionais (por exemplo, ácidos, aminas, anéis aromáticos, carboidratos, ésteres, fenóis e ligações do tipo amida). Elas podem interagir com o soluto por meio de pontes de hidrogênio, interações dipolo, ligações π - π , interações hidrofóbicas e eletrostáticas e por impedimento estérico (THOMPSON, 2005).

Há dois tipos de FEQ de teicoplanina, sendo uma com os açúcares removidos, e que possuem enantiosseletividade diferentes. As colunas podem ser

utilizadas em fase normal, reversa, polar orgânico e nos modos sub- ou supercrítico. Estas colunas possuem boa seletividade para aminoácidos e outros ácidos carboxílicos, mas também conseguem resolver solutos neutros e básicos (AHUJA, 1997; THOMPSON, 2005).

Quando em fase reversa, as interações predominantes são eletrostáticas e hidrofóbicas. No modo polar orgânico, acredita-se que as interações eletrostáticas sejam também predominantes, mas as interações hidrofóbicas ficam enfraquecidas e há favorecimento de interações do tipo dipolo e pontes de hidrogênio em relação à fase reversa. No modo normal, a fase móvel geralmente utilizada é composta por misturas de hexano : álcool, além de trietilamina e ácido trifluoroacético serem empregados como aditivos. Os aditivos podem ser utilizados para ionizar a FEQ e os solutos, bem como para reduzir interações não-específicas secundárias (THOMPSON, 2005).

4.5.1.3.8. Outras fases estacionárias quirais

FEQs derivadas de alcaloides de cinchona, quinidina e quinina vêm sendo introduzidas no mercado, sob a forma de carbamatos imobilizados em suportes de sílica. As mesmas apresentam boa enantiosseletividade para ácidos quirais. Elas apresentam boa enantiosseletividade em fase normal, porém são mais utilizadas no modo reverso. Estas fases são classificadas como trocadores de ânions quirais fracos, pois os alcaloides de quinina e quinidina são contra íons para ácidos carboxílicos e ácidos sulfônicos (interações por meio de pareamento iônico). Em separações em fase normal não ocorrem interações por pareamento iônico e acredita-se que as interações que ocorrem sejam semelhantes às que ocorrem em FEQs do tipo Pirkle (THOMPSON, 2005).

Uma classe relativamente nova de FEQ são derivados de ciclofrutano, as quais parecem ter grande potencial de aplicação. O ciclofrutano possui um núcleo de éter coroa e unidades de frutofurano. O ciclofrutano funcionalizado com grupamento isopropil-carbamato foi relatado como sendo considerada a FEQ mais amplamente aplicável para analitos contendo grupamentos amino primários e pode ser utilizada

de forma mais eficaz com solventes orgânicos e fluidos supercríticos do que as atuais FEQs de éter coroa. Classes de compostos quirais relatados que podem ser separadas por este tipo de FEQ incluem ácidos, aminas, complexos de metais, e compostos neutros (WARD, 2012).

4.5.2. Eletroforese capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE, do inglês “capillary electrophoresis”) é definida como o transporte de compostos eletricamente carregados em solução sob influência de um campo elétrico, onde a separação entre dois solutos ocorre pela diferença entre as mobilidades eletroforéticas (KUHN, 1993). Pode ser utilizado meio aquoso ou orgânico e podem ou não conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram a mobilidade eletroforética para realizar a separação. Esta técnica também é conhecida como eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês “capillary zone electrophoresis”) ou eletroforese capilar em solução livre (FSCE, do inglês “free solution capillary electrophoresis”) (SILVA et al., 2007). A eletroforese capilar vem recebendo atenção especial para a separação de enantiômeros e, cada vez mais, vem sendo considerada como importante técnica complementar às análises de CLAE, cromatografia de fluido supercrítico e cromatografia gasosa capilar (VERLEYSEN, 1998).

A CE é caracterizada pela simplicidade da instrumentação utilizada, conforme pode ser observado na Figura 4. Os componentes principais do equipamento são um fornecedor de alta voltagem e um capilar de diâmetro estreito (25-100 μm) preenchido com eletrólito condutor, que passa através do centro óptico de um sistema de detecção conectado a um dispositivo de aquisição de dados.

Figura 4 – Esquema de um sistema de eletroforese capilar (adaptado) (XU, 1996)

A aplicação de um potencial elétrico através do capilar gera movimentos eletroforéticos e eletroosmóticos. O movimento eletroforético ou mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica, o que faz com que cátions migrem em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e os ânions migrem em direção ao ânodo (eletrodo positivo). Quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior será sua mobilidade (BONATO et al., 2005). A mobilidade eletroforética de uma espécie química geralmente é determinada pelo seu tamanho e número de cargas dos íons e pode ser calculada segundo a Equação 1:

$$\mu_E = \frac{\left(\frac{q}{6\pi}\right)}{\eta r}$$

Equação 1 – Mobilidade eletroforética

Onde:

μ_E = mobilidade eletroforética;

q = carga;

η = viscosidade da solução;

r = raio do íon.

Por outro lado, o movimento eletroosmótico origina-se no ânodo, segue em direção ao cátodo e bombeia eficientemente os íons do soluto ao longo do capilar em direção ao detector. Este movimento, denominado fluxo eletroosmótico (EOF, “Electroosmotic Flow”), ocorre em razão da ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar de sílica quando em contato com a solução tampão (BONATO et al., 2005). O fluxo eletroosmótico do tampão geralmente é maior que a mobilidade eletroforética de solutos carregados negativamente. O fluxo eletroosmótico pode ser forte o suficiente a ponto de carregar moléculas pequenas, com ânions triplamente carregados até o eletrodo negativo (BAKER, 1995; BLANCO, 2003; GÜBITZ, 2001; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003).

Uma vez que solutos aniônicos são puxados pela carga positiva do ânodo, eles se movem em uma velocidade menor do que o fluxo eletroosmótico. Solutos neutros, por sua vez, não são influenciados pela mobilidade eletroforética e se movem pelo capilar na mesma velocidade do fluxo eletroosmótico. Solutos carregados positivamente migram em direção ao eletrodo negativo sob influência da mobilidade eletroforética e do fluxo eletroosmótico. Os solutos carregados se separam devido à diferença na mobilidade eletroforética, enquanto que o soluto neutro se separa dos solutos carregados, mas não um do outro, conforme exemplificado na Figura 5. Os solutos com a maior mobilidade, e primeiros a migrarem pelo capilar, são cátions pequenos altamente carregados. Moléculas neutras podem ser separadas umas das outras por meio da cromatografia capilar eletrocinética micelar (BAKER, 1995; BLANCO, 2003; GÜBITZ, 2001; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003).

Figura 5 – Migração de solutos neutro, aniônico e catiônico em um capilar devido ao fluxo eletroosmótico e mobilidade eletroforética (adaptado) (BAKER, 1995)

No caso da eletroforese capilar, para que haja separação quiral, além de haver diferença de energia de interação entre os enantiômeros para a formação dos complexos diastereoméricos, é necessário que haja diferença de mobilidade entre as formas livres e associações diastereoméricas (JUVANCZ et al., 2008). A separação ocorrerá se os íons do analito, sob influência de um campo elétrico contínuo, migrarem pelo detector com velocidades diferentes. A diferença de mobilidade eletroforética das moléculas com carga no soluto irá levar à separação das mesmas, que tenderão a migrar para o eletrodo que possui carga oposta à da molécula. A separação fará com que cátions migrem para o pólo negativo (cátodo) e os ânions migrem para o pólo positivo (ânodo), e partículas neutras não sejam atraídas para nenhum dos pólos (BAKER, 1995; BLANCO, 2003; GÜBITZ, 2001; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003). No caso de enantiômeros neutros, eles não são separados quando se utiliza seletor quiral neutro, pois a velocidade de migração dos enantiômeros é igual à força eletroosmótica das formas livre e associada. A separação de enantiômeros neutros geralmente requer o uso de seletores quirais com carga, ou uma combinação de seletor neutro com micelas aquirais que possuam carga (BAKER, 1995; BLANCO, 2003; GÜBITZ, 2001; JUVANCZ et al., 2008; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003).

Quando um tampão é inserido em um capilar, a superfície interna do capilar adquire carga. Isso pode ser causado devido à ionização da superfície do capilar ou adsorção dos íons do tampão no capilar. Até mesmo capilares de *teflon* possuem fluxo eletroosmótico, que provavelmente se deve à adsorção das cargas iônicas do tampão nas paredes do capilar. No caso de capilares de sílica fundida, a superfície dos grupos silanóis (Si-OH) é ionizada em grupos silanoato carregados negativamente (Si-O^-) em pH em torno de 3. Estas cargas negativas dos grupos silanoato atraem cátions do tampão carregados positivamente, formando então uma camada interna de cátions nas paredes do capilar. Duas camadas são formadas, pois apenas uma camada de cátions não possui densidade o suficiente para neutralizar todas as cargas negativas, porém a segunda camada formada não possui fixação tão forte quanto a primeira, pois estas estão mais distantes dos grupos silanoato (Figura 6). Quando um campo elétrico é aplicado, esta camada mais externa é puxada em direção ao cátodo. Como esses cátions estão solvatados,

eles arrastam a maior parte do tampão, causando o fluxo eletroosmótico (BAKER, 1995; BLANCO, 2003; GÜBITZ, 2001; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003).

Figura 6 – Representação do fluxo eletroosmótico em um capilar (adaptado) (BAKER, 1995)

A separação por CE baseia-se nas diferenças das relações carga-massa dos vários analitos em uma amostra. Assim, quanto maior esta razão, mais rápido o íon migra no campo elétrico (FORET et al., 1993; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004b). A velocidade eletroforética irá variar conforme a potência aplicada, e pode ser estabelecida com base na equação a seguir (ALTRIA, 1996a):

$$v = \mu E * E$$

Equação 2 – Velocidade eletroforética

Onde:

v = velocidade do íon;

E = diferença de potencial aplicada (volts.cm^{-1})

A mobilidade iônica pode ser influenciada pelo valor de pK_a , ou seja, quanto mais ionizado, maior será a mobilidade. Desta maneira, a manipulação do pH possui efeito determinante na mobilidade relativa dos íons.

As principais diferenças da eletroforese capilar em relação à cromatografia líquida são o perfil de velocidade mais linear regido pelo fluxo eletroosmótico do eletrólito de corrida e os efeitos do forte campo eletrostático em medidas eletroquímicas que impõem exigências especiais com relação ao posicionamento

dos eletrodos voltamétricos (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004a).

A eletroforese capilar, assim como a CLAE, também possui dois caminhos para as separações enantioméricas dos fármacos: o método indireto e o método direto (ver itens 4.5.1.1 e 0). Os métodos indiretos incluem a derivatização dos enantiômeros com um reagente quiral puro e a utilização da eletroforese capilar convencional para se obter a separação dos diastereoisômeros. Os métodos diretos são mais empregados na atualidade. Eles incluem a formação de complexos transitórios dentro dos capilares e eventuais separações devido às mobilidades eletroforéticas e/ou mobilidades eletroosmóticas dos complexos, seletores quirais - os antípodas. Devido à conformação espacial dos átomos, os enantiômeros interagem de maneira diferente com os seletores quirais (ex. ciclodextrina) presentes na fase móvel (tampão). Caso os enantiômeros possuam diferentes constantes de ligação, a diferença de interação entre enantiômeros e seletor quiral levará à formação de complexos transitórios com características diferentes e que, assim, podem ser eluídos com tempos de retenção diferentes. Solutos com carga podem ser separados utilizando seletores quirais neutros, enquanto que enantiômeros neutros necessitam de seletores quirais com carga para poderem ser separados. (ALTRIA et al., 1998; BAKER, 1995; BLANCO, 2003; BONATO, 2004; GÜBITZ, 2001; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; VERLEYSEN, 1998; WARD, 2012; WÄTZIG, 2003).

Os capilares utilizados são normalmente feitos de sílica fundida. Este material confere propriedades importantes aos capilares, entre as quais estão: dimensões precisas, alta constante dielétrica, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica, resistência mecânica, maleabilidade, resistência a ataques químicos, alta transmitância para uma faixa entre 190 e 900 nm, além de ser responsável pelo fluxo eletroosmótico. Capilares com diâmetro interno entre 20 e 100 µm e comprimento variando entre 50 e 75 cm são frequentemente utilizados. Quando realiza-se separação de moléculas pequenas, capilares de sílica fundida sem revestimento são mais comumente empregados. Para evitar adsorção à superfície dos analitos ou componentes da matriz, e para eliminar ou controlar o fluxo eletroosmótico, revestimentos de superfície ou modificações químicas dos grupos silanóis podem ser necessárias. Revestimentos neutros e carregados vêm sendo utilizados com

sucesso em diversas aplicações (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004b; TAVARES, 1996).

Injeções da amostra no capilar podem ser realizadas hidrodinamicamente criando uma diferença de pressão entre o tampão e os reservatórios de solução da amostra, enquanto a extremidade apropriada do capilar é mergulhada em uma solução de amostra. Utilizando-se a injeção eletrocinética, uma pequena tensão é aplicada por um tempo definido, sendo que uma extremidade do capilar é inserida no reservatório de amostra, enquanto que a outra extremidade é inserida em um reservatório de tampão. Idealmente, os efeitos de dispersão de zona durante a separação devem-se apenas à difusão longitudinal. Entretanto, a eletrodispersão (causada por diferença na mobilidade entre tampão e amostra), bem como gradientes de temperatura no interior do capilar podem causar alargamento de bandas (BAKER, 1995; BLANCO, 2003; GÜBITZ, 2001; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004b; KUHN, 1993; NGUYEN, 1996; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003).

A técnica de introdução da amostra, sobrecarramento de amostra, o tipo de amostra e sua matriz e os fenômenos de adsorção na paredes capilares podem tornar-se fontes adicionais de dispersão de zona. O controle de temperatura do capilar, a escolha de um meio tamponante adequado, a técnica de tratamento de superfície, o tipo de amostra e a forma como a amostra é introduzida no capilar podem ser cruciais para o sucesso de uma determinada separação. Aditivos, tais como solventes, ciclodextrinas ou polímeros, podem ser usados para controlar a migração e formas de pico de solutos (GÜBITZ, 2001; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004b; KUHN, 1993; USP 33, 2010).

Quando uma ciclodextrina é adicionada ao tampão de corrida, solutos insolúveis em água distribuem-se entre as micelas e as ciclodextrinas e não ficam na fase aquosa. Como as CDs são eletricamente neutras, elas migram com a velocidade do fluxo eletroosmótico. As ciclodextrinas também podem ser empregadas como parte de revestimentos de parede, géis rígidos e fase micelar dispersa. Capilares cheios de ligações cruzadas como, por exemplo, gel de poliacrilamida, podem ser utilizados para a separação baseada no tamanho de biomoléculas grandes. A incorporação de diferentes seletos quirais em um sistema de gel tem sido bem sucedida para separações quirais de pequenas moléculas.

Soluções de polímeros lineares emaranhados são frequentemente utilizadas na separação de biomoléculas. Em eletrocromatografia capilar, as separações são realizadas em colunas capilares contendo partículas empacotadas como em cromatografia líquida ou materiais monolíticos. Capilares tubulares revestidos abertos, semelhante às colunas capilares de cromatografia gasosa também podem ser empregados (BAKER, 1995; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004b; USP 33, 2010; WÄTZIG, 2003).

A eletroforese capilar oferece diversas vantagens em separações quirais, como: alta eficiência de separação que permite que haja resolução mesmo em casos onde enantiômeros do seletor e do soluto interagem de forma idêntica (uma diferença sutil assim provavelmente não poderia ser detectada por qualquer outra técnica); a capacidade de alterar o tampão, natureza e concentração do seletor quiral e reequilibrar o sistema rapidamente; capacidade de usar vários seletos em associação para melhorar a resolução quiral; baixo consumo de amostra e reagente, permitindo assim utilizar seletos mais caros; curto tempo de análise (BLANCO, 2003; VERLEYSEN, 1998).

Os diferentes modos de separação disponíveis em CE, combinados com seu alto poder de resolução, eficiência, necessidade de pequenas quantidades de amostra e custo de análise reduzido tornam-na uma técnica competitiva para resolução dos enantiômeros, sendo esta, muitas vezes, empregada como uma alternativa à CLAE (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2004b).

4.6. β -bloqueadores

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são as maiores causadoras de morte no mundo, matando 17,1 milhões de pessoas por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Relatórios de 2012 da OMS mostram que aproximadamente 33,3% da população sofre de problemas cardíacos. Entre as doenças mais comuns estão: hipertensão, angina pectoris, arritmias cardíacas, glaucoma, enxaquecas e tireotoxicose (SALEEM et al.,

2013). A hipertensão arterial é uma causa primária importante de insuficiência cardíaca e se enfatiza a necessidade de prevenção da doença, intervenção precoce e controle, com o objetivo de conter sua progressão e desenvolvimento. Atualmente, a insuficiência cardíaca é a segunda causa mais comum de doença cardiovascular na população e estima-se que será a primeira causa de morte por doença cardiovascular em 2025 (FIRMIDA, 2001).

Diversos fármacos utilizados no tratamento das doenças cardiovasculares são quirais e incluem antagonistas β , bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos. Além disso, os β -bloqueadores (antiarrítmicos classe II) e os bloqueadores dos canais de cálcio verapamil, galopamil e prenilamina (antiarrítmicos classe IV) também são utilizados no tratamento de arritmias juntamente com vários outros fármacos quirais pertencentes à classe I (NGUYEN, 1996; REDDY, 2004).

Todos os bloqueadores β -adrenérgicos possuem pelo menos um centro de assimetria. β -bloqueadores geralmente são utilizados para o tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão, angina pectoris e alguns tipos de arritmias. Os β -bloqueadores possuem alto grau de estereosseletividade para se ligar aos receptores β e normalmente a atividade β -bloqueadora cardíaca é associada ao enantiômero S(-). Uma exceção a esta regra é o sotalol, uma vez que o enantiômero R(-) possui a maior ação β -bloqueadora, porém ambos os enantiômeros são equipotentes em termos de atividade antiarrítmica classe III (REDDY, 2004). De um modo geral, os β -bloqueadores são absorvidos pelo trato gastrointestinal por difusão passiva, e este tipo de absorção não é considerado estereosseletivo. Fármacos pertencentes a esta classe ligam-se à albumina e α_1 -glicoproteína no plasma. O sotalol possui alta quantidade de fração livre no plasma, e sua ligação parece ser não-estereosseletiva. A eliminação da maioria destes β -bloqueadores ocorre via metabolização hepática e/ou excreção renal do fármaco inalterado, sendo que os β -bloqueadores lipofílicos são eliminados basicamente por metabolização e os β -bloqueadores mais hidrofílicos são predominantemente eliminados de forma inalterada pela urina (REDDY, 2004).

Os β -bloqueadores estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo (MORANTE-ZARCERO, 2012). No Brasil, os β -bloqueadores são comercializados em formas farmacêuticas variadas, podendo estar na forma de comprimidos, injetáveis, soluções oftálmicas (DEF, 2011). Devido ao grande número de pessoas

acometidas por doenças cardiovasculares, foram selecionados dois princípios ativos utilizados no tratamento de hipertensão (cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol) para serem desenvolvidos métodos de separação enantiosseletivo por CLAE e CE. Ambos fármacos pertencem à classe dos β -bloqueadores e seus enantiômeros possuem efeitos farmacológicos diferentes.

4.6.1. Esmolol

O esmolol (Figura 7), também conhecido pelo sinônimo ASL-8052 (McCONALTHY, 2003), é um antiarrítmico de classe II cuja ação principal é bloquear os adrenoreceptores β . É um agente cardiosseletivo antagonista que possui grande afinidade pelos receptores do subtipo β_1 e menor afinidade pelos receptores β_2 , sendo considerado um betabloqueador de segunda geração (BRUNTON et al., 2006; GRUETTER, 2007). Ele atua reduzindo a força e taxa de contração cardíaca através do bloqueio dos receptores β -adrenérgicos do sistema nervoso simpático, que são encontrados principalmente no coração, impedindo a ação de duas substâncias que ocorrem naturalmente no organismo: a epinefrina e a norepinefrina (DRUG BANK, 2012). Ao contrário de outros fármacos desta classe, o cloridrato de esmolol não causa estabilização de membrana nem atividades simpatomiméticas intrínsecas e possui baixa solubilidade lipídica (GRUETTER, 2007).

* carbono assimétrico

Figura 7 – Fórmula estrutural do esmolol (adaptado) (MARTINDALE, 2009)

O bloqueio dos receptores β adrenérgicos ocorre de 5 a 10 minutos após o início de infusão intravenosa de esmolol. A duração de sua ação é curta, com reversão dos efeitos hemodinâmicos em 30 minutos após a interrupção da infusão.

Seu tempo meia vida *in vivo* é de aproximadamente 9 minutos (BRUNTON et al., 2006; GRUETTER, 2007; MARTINDALE, 2009; TANG et al., 2004), porém em pacientes com falência hepática, o tempo de meia vida é de até 16 minutos (MOFFAT et al., 2004).

O esmolol é considerado como um fármaco de ação ultrarrápida, sendo rapidamente metabolizado pela hidrólise da ligação éster (através de estearases no sangue) em metanol e em um metabólito ácido (ácido metil 3-{4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil} propiônico). Este metabólito ácido, também chamado de ASL-8123, possui baixa afinidade pelos receptores β (ERHARDT, 2009; GRUETTER, 2007; HOFFMAN, 2007). O esmolol possui ligação de 55% às proteínas plasmáticas, enquanto que o metabólito ASL-8123 possui ligação de apenas 10% (MARTINDALE, 2009; MOFFAT et al., 2004).

O tempo de meia vida do metabólito ácido é de 3,7 horas (MOFFAT et al., 2004). A excreção do esmolol ocorre primariamente pela via urinária como metabólito di-esterificado (71 a 83%) e menos de 2% do mesmo aparecem na forma não alterada e como metabólitos inativos. O restante da dose pode ser detectado nas fezes. Apenas pequenas quantidades do metabólito são removidas por diálise. O metabólito acumula no organismo de pacientes que possuem falência renal (MOFFAT et al., 2004).

Devido à sua rápida inativação pelas estearases das hemácias, o esmolol é administrado somente por via intravenosa e é utilizado quando se deseja um bloqueio de curta duração dos receptores β_1 ou em pacientes com doenças graves quando uma descontinuação rápida de bloqueadores de receptores β seja necessária (BENOITZ, 2007; BRUNTON et al., 2006; GRUETTER, 2007). Este fármaco é utilizado na forma de cloridrato primariamente para o controle rápido e de curta duração da frequência ventricular em pacientes com fibrilação atrial ou taquicardia no período peri operatório, pós operatório ou outras situações emergenciais (DRUG BANK, 2012; GRUETTER, 2007). O esmolol também é utilizado para tratar múltiplos episódios de fibrilação ventricular após infarto do miocárdio, para a proteção miocárdica durante cirurgias cardíacas e para controlar as mudanças de frequência cardíaca associadas à toxicidade causada por medicamentos, feocromocitoma, tétano, distúrbios da tireóide, e eletroconvulsoterapia (GRUETTER, 2007; HOFFMAN, 2007). Quando um paciente

estiver utilizando cloridrato de esmolol e o tratamento for transferido para outro tipo de antiarrítmico, a taxa de infusão de cloridrato de esmolol deve ser reduzida pela metade trinta minutos antes de iniciar a utilização da outra medicação e deve ser interrompida uma hora após a segunda dose da nova medicação (MARTINDALE, 2009).

Em termos de importância e potencial enantiosseletividade desta rota metabólica, a determinação dos enantiômeros do esmolol e seu metabólito ácido parecem ser mais significantes (ERHARDT, 2009). Assim como a maioria dos bloqueadores β -adrenérgicos, o *S*-(-)-esmolol possui efeitos bloqueadores, enquanto que *R*-(+)-esmolol é inativo (TANG et al., 2004).

4.6.1.1. Dados físicos e químicos do esmolol

O esmolol, que possui fórmula molecular $C_{16}H_{25}NO_4$, também pode ser denominado como: ácido metil éster 4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]benzeno propanoico, ($\pm$)-metil 3-[4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil]propionato e metil *p*-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]hidrocinamato (MERCK, 2001).

O esmolol é um óleo, que gradualmente cristaliza à temperatura ambiente. Ele possui ponto de fusão de 48 a 50 °C (MOFFAT et al., 2004). Seu peso molecular é de 258,9 g/mol, seu logP é $1,92 \pm 0,26$ e pK_a mais básico equivalente é de $9,43 \pm 0,10$ (*apud* SciFinder).

4.6.1.2. Dados físicos e químicos do cloridrato de esmolol

O cloridrato de esmolol, que possui fórmula molecular $C_{16}H_{25}NO_4 \cdot HCl$, também pode ser denominado como ASL-8052 ou como cloridrato ácido metil éster 4-[2-hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]benzeno propanoico (MARTINDALE, 2009; MOFFAT et al., 2004).

O cloridrato de esmolol é um pó cristalino esbranquiçado, que é relativamente hidrofílico. Seu peso molecular é de 295,37 g/mol e seu ponto de fusão é de 85 a 86 °C. É muito solúvel em água e facilmente solúvel em álcool. O seu logP (octanol/água, pH 7) é de 0,42 e pK_a equivalente é de 9,5 (MOFFAT et al., 2004).

4.6.2. Sotalol

O sotalol (Figura 8) é um antagonista dos receptores β adrenérgicos não seletivo desprovido de estabilização de membrana, efeitos simpatomiméticos intrínsecos ou atividades anestésicas locais. Devido ao fato de também prolongar a repolarização cardíaca através do bloqueio dos canais de potássio, ele é classificado como um antiarrítmico de classe III e classe II (bloqueador dos adrenoreceptores β) (GRUETTER, 2007; HOFFMAN, 2007; HUME, 2007). Este fármaco é totalmente absorvido após administração por via oral e o mesmo não se liga às proteínas plasmáticas (GRUETTER, 2007). O sotalol possui um centro quiral e consequentemente dois enantiômeros. A forma racêmica disponível no mercado é empregada no tratamento de hipertensão, angina pectoris e arritmias cardíacas (GRUETTER, 2007; HUME, 2007).

* carbono assimétrico

Figura 8 – Fórmula estrutural do sotalol (adaptado) (MARTINDALE, 2009)

A atividade bloqueadora dos receptores β é atribuída basicamente ao enantiômero (R)-(-), enquanto que o (S)-(+) e o (R)-(-)-sotalol prolongam o potencial de ação, sendo assim considerados agentes antiarrítmicos classe III equipotentes (BRUNTON et al., 2006; FULDE, 1999; HUME, 2007). O sotalol age nas fibras de Purkinje e nos músculos ventriculares. Quando administrado por via intravenosa (0,2-0,6 mg / kg), ele reduz a frequência cardíaca e débito cardíaco sem mudança no

volume de ejeção, com ou sem a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo estar elevada. Aparentemente ele não possui nenhum efeito na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. O sotalol provoca um modesto aumento na fração de ejeção em pacientes com redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (GRUETTER, 2007). A ação betabloqueadora não é cardiosseletiva e é máxima em dose inferior à necessária para que haja prolongação do potencial de ação (HUME, 2007).

A concentração plasmática máxima do sotalol após administração por via oral é atingida após aproximadamente 2 a 3 horas. Sua biodisponibilidade é próxima de 100%, porém é reduzida pela presença de alimentos. Sua ligação às proteínas plasmáticas é insignificante. Apesar do sotalol atravessar livremente a placenta, sua biodisponibilidade ou tempo de meia-vida não são afetados. O sotalol é distribuído no leite materno e sua concentração pode ser maior do que a que se apresenta no soro materno (MARTINDALE, 2009). Seu tempo de meia vida plasmática é de 10 a 20 horas, sendo maior em pacientes com insuficiência renal e em pacientes idosos. Até 75% da dose de sotalol administrada é excretada pela urina sob forma inalterada em 72 horas após a ingestão do mesmo. Menos de 10% é eliminado através das fezes, pelo fato de possuir uma farmacocinética relativamente simples. O sotalol possui poucas interações medicamentosas diretas (GRUETTER, 2007; MOFFAT et al., 2004). O seu volume de distribuição e depuração são diminuídos e seu tempo de meia-vida aumentado em pacientes idosos. Uma vez que o sotalol é eliminado primariamente pela urina, ajustes de dose são necessários em pacientes que possuem diminuição da depuração renal (GRUETTER, 2007). Pequenas quantidades de sotalol atravessam a barreira hematoencefálica e entram o líquido cerebro-espinhal. O sotalol é removido por diálise (MARTINDALE, 2009).

4.6.2.1. Dados físicos e químicos do sotalol

O sotalol, que possui fórmula molecular $C_{12}H_{20}N_2O_3S$, também pode ser denominado como: N-[4-[1-hidroxi-2-[(1-metiletil)amino]etil]fenil]-metanosulfonamida ou 4'-[1-hidroxi-2-(isopropilamino)etil]metanosulfonanilida.

O sotalol se apresenta sob a forma de cristais e possui ponto de fusão de aproximadamente 207 °C (MOFFAT et al., 2004). Seu peso molecular é de 272,36 g/mol, seu logP é 0,240±0,369 e pK_a mais básico equivalente é de 9,31±0,10 (*apud* SciFinder).

4.6.2.2. Dados físicos e químicos do cloridrato de sotalol

O cloridrato de sotalol, que possui fórmula molecular C₁₂H₂₀N₂O₃S . HCl, também pode ser denominado como: MJ-1999, d,l-cloridrato de sotalol, cloridrato de N-[4-[1-hidroxi-2-[(1-metiletil)amino]etil]fenil]-metanosulfonamida (MARTINDALE, 2009). De acordo com a Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopeia*, USP 33) (USP 33, 2010), pode ainda ser chamado como: monohidrocloridrato de N-[4-[1-hidroxi-2-[(1-metiletil)amino]etil]fenil]-metanosulfonamida, ou monohidrocloridrato de 4'-[1-hidroxi-2 (isopropilamino)etil]metanosulfonanilida. Seu peso molecular é de 308,83 g/mol (USP 33, 2010).

O cloridrato de sotalol é um pó cristalino de coloração esbranquiçada a creme e possui ponto de fusão de 206 a 207 °C, com decomposição. Também há relatos de ponto de fusão entre 218 e 219 °C (MERCK, 2001). É facilmente solúvel em água, solúvel em álcool, ligeiramente solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em diclorometano (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; MOFFAT et al., 2004) e deve ser acondicionado em recipiente hermeticamente fechado (USP 33, 2010) e ao abrigo da luz (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009a). O seu logP (octanol/água) é de 0,2 e seu pK_a equivalente é de 8,2; 9,8 (MOFFAT et al., 2004). O logP do cloridrato de sotalol em octan-1-ol/ tampão fosfato, em pH 7,4 e a 37 °C é de 0,09 (MERCK, 2001).

4.7. Separação enantiomérica de esmolol e sotalol

Existe uma tendência crescente em todo o mundo da comercialização de fármacos na forma enantiomérica pura. Desta forma, o desenvolvimento de métodos analíticos para obtenção, separação e quantificação de enantiômeros puros torna-se essencial neste cenário. A importância disso deve-se, por exemplo, à necessidade separar e quantificar enantiômeros presentes em formulações farmacêuticas e/ou até mesmo em matrizes biológicas e de avaliar perfis farmacológicos dos enantiômeros, entre outros fatores. Através das técnicas de CLAE-FEQ e eletroforese capilar utilizando seletores quirais é possível separar enantiômeros de forma direta, sem que haja a necessidade de realizar etapas complexas de preparo de amostra como, por exemplo, a derivatização, que representa um dispêndio de tempo e custo para analistas e para indústrias.

Apesar de haver trabalhos propondo métodos de separação enantiomérica do esmolol e sotalol empregando CLAE (Tabela 2) e eletroforese capilar (Tabela 3), a maior parte destes apresenta apenas a utilização de diversos tipos de seletores quirais e diferentes composições de fase móvel e eletrólitos, havendo pouca preocupação em relação à separação efetiva dos enantiômeros e, principalmente, em relação à sua quantificação. A maioria dos artigos citados não especifica a resolução obtida entre os enantiômeros, não sendo possível, portanto, avaliar se efetivamente houve separação.

Tabela 2 - Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CLAE

Sistema / coluna	Fase móvel	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
LC-UV / Chiralcel OD-RH	0,5 M NaClO ₄ pH 3,0 : ACN (87,5:12,5 v/v)	40 min *	ESM/ amostra biológica	25 ng/mL	Fang et al., 2010
LC-UV / Sepapak-2	ACN:0,1% DEA: ácido (variação no tipo - ácido trifluoroacético, ácido acético glacial ou ácido fórmico- e proporção de ácido)	**	SOT/ solução padrão	-	Dossou et al., 2011
LC-UV / Sepapak-4	ACN: 0,1% DEA: 0,2% ácido fórmico: 7,5% Hex	25 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Dossou et al., 2010
LC-UV / AGP	Tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0: MeOH (90:10, v/v) + dimetiloctilamina (variação na concentração de DMOA)	3 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Barbato et al., 2009
LC-DAD / Sepapak-4	ACN:0,1% DEA: ácido (variação no tipo - ácido trifluoroacético, ácido acético glacial ou ácido fórmico- e proporção de ácido)	*	SOT/ solução padrão	-	Dossou et al., 2009
LC-ESI-MS / coluna preparada em laboratório contendo teicoplanina	25mM formiato de amônia em MeOH: ACN: ácido acético glacial: trietilamina (70:30:0,025:0,025 (v/v/v/v))	15 min	SOT/ amostra biológica e solução padrão	4 ng/mL	Badaloni et al., 2003
LC-UV /pré-coluna LiChrospher RP-18 ADS e coluna chiral-CBH	Pré-coluna LiChrospher RP-18 ADS. Fase móvel: tampão fosfato 10 mM, pH 7,4: MeOH (99:1) Coluna Chiral-CBH. Fase móvel: tampão fosfato 10 mM, pH 7,0: IPA (85:15) + 0,05 mM EDTA	18 min	SOT/ amostra biológica	37 µg/L	Schlauch et al., 2002

Tabela 2 - Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CLAE (Continuação)

Sistema / coluna	Fase móvel	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
LC-fluorescência e UV / Chiral-CBH I	Tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0 : IPA (95:5) (variação na temperatura)	20 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Fulde, 1999
LC-MS/MS / Chiralpak AD	Álcool:hex: IPA: DEA (30:63:7:0,17, v/v)	8 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Alebic-Kolbah, 1997
LC-UV / Chiral-AGP	Tampão fosfato 10 mM: MeOH (diferentes pH e proporções)	**	SOT/ solução padrão	-	Ceccato, 1997
LC-UV / Enantiopac	Tampão fosfato 10 mM, pH 7,0: 15 mM ácido heptanóico	8 min	SOT/ solução padrão	25,9 ng/ml (1° pico); 38,3 ng/ml (2° pico)	Ceccato, 1997
LC-UV / (R)- α -Burke I	Diclorometano: EtOH: 0,5 g/L de acetato de amônio (diferentes proporções)	*	SOT/ solução padrão	-	Petersen et al., 1997
LC-UV / celulose com benzoato nas posições 2 e 3 e fenilcarbamatos meta-substituído na posição 6; 3,5-dimetilfenilcarbamato nas posições 2 e 3 e 1 feniletilcarbamato na posição 6	Hex:IPA (variação nas proporções; diferentes tipos de modificadores orgânicos)	*	SOT/ solução padrão	-	Chassaing et al., 1996
LC-UV / Chiralcel OD	Hex:IPA:DEA (variação nas proporções)	*	SOT/ solução padrão	-	Ekelund et al., 1995

Tabela 2 - Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CLAE (Continuação)

Sistema / coluna	Fase móvel	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
LC-UV / Hypercarb	L-ZGP ou L-ZGGP: modificador orgânico (diferentes concentrações e tipos de modificadores orgânicos)	N.I.	SOT/ solução padrão	N.I.	Huynh et al., 1995
LC-UV / Chiral AGP	IPA: tampão fosfato 0,02M (diferentes proporções e pH)	*	SOT/ solução padrão	-	Vandenbosch et al., 1992
LC-UV / Chiralcel OD	Heptano: IPA: DEA (80:20:0,1; v/v/v) (isopropilamina ou EtOH)	**	SOT/ solução padrão	-	Vandenbosch et al., 1992
LC-UV / Ultron ES OVM ou cellulase CSP	Tampão fosfato 0,02 M: EtOH (variação do pH, tipo de fase orgânica – EtOH, IPA –, tipo de tampão – tampão fosfato ou acetato- e proporções)	*	SOT/solução padrão	-	Vandenbosch et al., 1992
LC- UV / N,N'-(3,5-dinitrobenzoi)-trans,2-diaminociclohexano	Diclorometano: MeOH (99:1)	15 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Gasparrini et al., 1991

LQ = limite de quantificação; MeOH = metanol; ESM = esmolol; EtOH = etanol; SOT = sotalol; hex = hexano; DEA = dietilamina; ACN = acetonitrila; L-ZGP = N-benziloxycarbonilglicil-L-prolina; L-ZGGP = N-benziloxycarbonilglicil-L-prolina; IPA = isopropanol; EDTA = ácido etilenodiaminotetracético; DMOA = dimetiloctilamina; N.I. = não informado; * Ausência de separação ou separação ineficaz; ** Não houve enantiosseletividade visível ou resolução

Tabela 3 - Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CE

Capilar	Seletor quiral	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
Sílica fundida sem revestimento, 75 µm d.i. x 60 cm (50 cm até o detector)	Carboximetil-β-CD	26 min	ESM/ padrão	0,25 µg/mL	Huang et al., 2008
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 50 cm (24,5 cm até o detector)	Sulfobutil- β –CD	9 min	ESM/ padrão	N.I.	Liu et al., 1999
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 48 cm (30 cm até o detector)	Diferentes CD neutras	N.I.	ESM/ padrão	N.I.	Ren et al., 1999 ^a
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 43,5 cm (35 cm até o detector)	Sulfobutil- β –CD	4 min	ESM/ padrão	N.I.	Ren et al., 1999b
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 53 cm (45 cm até o detector)	Complexo ácido bórico di-n-amil L-tartarato	12 min	SOT/ padrão	-	Wang et al., 2011
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 51 cm (43,5 cm até o detector) ou 50 µm d.i. x 81 cm (73,5 cm até o detector)	Complexo de ácido bórico di-n-butil l-tartarato	*	SOT/ comprimido	-	Hu et al., 2009
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 48,5 cm (40 cm até o detector)	heptacis(2,3-di-O-metil-6-O-sulfo)-β-CD	28 min	SOT/ padrão	N.I.	Rousseau et al., 2009
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 26 cm ou 50 µm d.i. x 39 cm	Hidroxipropil- β-CD ou RAMEB (β-CD metilada aleatoriamente)	14 min/ 38 min/ 11 min	SOT/ padrão	N.I.	Gagyi et al., 2008
Sílica fundida sem revestimento, 75 µm d.i. x 60 cm (50 cm até o detector)	Carboximetil-β-CD	17 min	SOT/ padrão	0,05 µg/mL	Huang et al., 2008

Tabela 3 – Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CE (continuação)

Capilar	Seletor quiral	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
Sílica fundida, 50 µm d.i x 33,5 cm (25 cm efetivo)	Diferentes seletores quirais	9 min/ 11min/ 10 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Jiang et al., 2008
Coluna capilar monolítica, 100 µm d.i. x 33,5 cm (25 ou 8,5 cm até o detector)	Ácido trans-(1S,2S)-2-(N-4-aliloxi-3,5-diclorobenzoil) amino ciclohexanosulfônico	23 min 8 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Preinerstorfer et al., 2008
Sílica fundida, 75 µm d.i x 37 cm (30 cm efetivo)	Carboximetil-β-CD	18 min	SOT/ comprimido	N.I.	Zhang et al., 2008
Sílica fundida com revestimento de poliacrilamida, 50 µm d.i x 31,5 cm (23 cm até o detector)	Ácido diisopropilidenocetoglucônico ou ácido cetopínico	N.I.	SOT/ solução padrão	N.I.	Hedeland et al., 2007
Sílica fundida, 50 µm d.i. x 65 cm (56,5 cm até o detector)	HSA (human serum albumin)	*	SOT/ solução padrão	-	Martínez-Gómez et al., 2006
Coluna capilar monolítica, 100 µm d.i. x 33,5 cm (25 cm até o detector)	Ácido (S)-N-(4-aliloxi-3,5-diclorobenzol)-2-amino-3,3-dimetilbutanofosfônico	N.I.	SOT/ solução padrão	N.I.	Preinerstorfer et al., 2006
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 57 cm (50 cm até o detector)	β-CD-sulfatada	21 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Yang et al., 2005

Tabela 3 – Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CE (continuação)

Capilar	Seletor quiral	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
Sílica fundida, 100 µm d.i. x 33,5 cm (25 cm até o detector)	Diferentes seletos quirais	8 min*/ 13 min/ 10 min/ 11 min	SOT	-	Hebenstreit et al., 2004
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 57 cm (50 cm até o detector)	Multicamada de polieletrólitos composta por polipeptídeo poli(L-lisina) e surfactante dipeptídeo polimérico poli(L-SULA) ou poli(L-SUAL)	20 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Kamande et al., 2004
Sílica fundida com revestimento de álcool polivinílico, 50 µm d.i. x 27 cm (20 cm até o detector)	Hepaticis(2,3-diacetil-6-sulfo)-β-CD	10 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Awadallah et al., 2003
Sílica fundida com revestimento de poliimida, 100 µm d.i. x 40 cm	Diferentes seletos quirais	*	SOT/ solução padrão	—	Constantin et al., 2003
Sílica fundida 50 µm d.i. x 68,5 cm	Ácido (-)-2,3:4,6-di-O-isopropilideno-2-ceto-L-glucônico	25 min	SOT/ solução padrão	-	Lodén et al., 2003
Sílica fundida, 100 µm d.i. x 31,2 cm (21 cm até o detector)	Chiralcel OD-H ou Chiralpak AD-H	16 min * 25 min *	SOT/ solução padrão	N.I.	Mangelings et al., 2003
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 48,5 cm (40 cm até o detector)	Diferentes seletos quirais	*	SOT/ solução padrão	N.I.	Servais et al., 2003

Tabela 3 – Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CE (continuação)

Capilar	Seletor quiral	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
Sílica fundida, 100 µm d.i x 36 cm (27,5 cm efetivo)	Teicoplanina aglicona	16 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Grobuschek et al., 2002
Sílica fundida sem revestimento, 75 µm d.i x 80 cm (60 cm efetivo) ou com revestimento de brometo de didodecildimetilamônio, 75 µm d.i x 80 cm (60 cm efetivo)	β-CD sulfatada	40 min 18 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Zhong, 2002
Sílica fundida, 75 µm d.i x 33,5 cm (25 cm até o detector)	Teicoplanina	1° pico em 12 min. 2° pico não informado R _s = 2,13	SOT/ solução padrão	N.I.	Karlsson et al., 2000
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 43,3 cm (37,1 cm até o detector)	Carboximetil-β-CD	13 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Vargas et al., 1999
Sílica fundida com revestimento de poliácridamida, 50 µm d.i. x 29 cm (24,5 cm até o detector)	Hidroxipropil-β-CD	11 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Bingcheng, 1998
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 44 cm (37 cm até o detector)	carboximetil- β –CD	N.I.	SOT/ solução padrão	N.I.	Fillet et al., 1998
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 29 cm (24,5 cm até o detector)	Hidroxipropil-α-CD	7 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Koppenhoefer et al., 1998

Tabela 3 – Metodologias para separação enantiomérica do esmolol e do sotalol empregando CE (continuação)

Capilar	Seletor quiral	Tempo de análise	Analito/ Matriz	LQ	Referência
Sílica fundida, 75 µm d.i x 37 cm (30 cm efetivo) ou sílica fundida, 75 µm d.i x 47 cm (40 cm efetivo)	Hidroxipropil-β-CD e íons tetrapentilamônio	35 min	SOT/ solução padrão	0,2% (p/p) para impureza de D-SOT na injeção de 2,5 mM de L-SOT e 5 µM de D-SOT	Stålberg et al., 1998
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 29 cm (24,5 cm até o detector)	Hidroxipropil-γ-CD	9 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Koppenhoefer et al., 1997
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 44 cm	Hidroxipropil-β-CD	N.I. *	SOT	N.I.	Bechet et al., 1994
Sílica fundida sem revestimento, 50 µm d.i. x 40 cm até o detector	Hidroxipropil-β-CD	15 min	SOT/ solução padrão	N.I.	Heuermann, 1993

LQ = limite de quantificação; CD = ciclodextrina; ESM = esmolol; SOT = sotalol; d.i.= diâmetro interno; Poli(L-SULA) = undecanoil-L-leucil-alaninato de sódio; Poli(L-SUAL) = undecanoil L-alanina leucinato de sódio; N.I. = não informado; * Ausência de separação

4.8. Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é definida como sendo o processo realizado por estudos laboratoriais onde são estabelecidas se as características de performance do método atendem às exigências para a aplicação analítica desejada.

As definições e conceitos sobre validação de metodologia analítica para produtos farmacêuticos podem ser encontradas em diversos compêndios oficiais e guias técnicos regulatórios, sendo fornecidas diretrizes que abrangem a validação de um modo geral e estabelecem padrões mínimos para a indústria farmacêutica. Entre os materiais internacionais disponíveis estão as Farmacopéias (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009b; FANG et al., 2010; USP 33, 2010), guias da *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC International), FDA (UNITED STATES, 2000; UNITED STATES, 1994), EURACHEM (EURACHEM, 1998), *European Medicines Agency* (EMA) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 1995), *International Standardization Organization/ International Engineering Consortium 17025* (ISO/IEC 17025) (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2005), *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002), além de guias e diretrizes de agências regulatórias e conferências como o ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005). Em relação à literatura nacional, estão legislações como a resolução RE nº 899, de maio de 2003 da ANVISA e normas do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010). Além destes materiais, há inúmeros artigos nacionais e internacionais que abrangem este assunto. Entretanto, apesar de haver vasta literatura sobre validação de metodologia analítica, há poucas informações específicas para a validação de metodologia analítica para a determinação e quantificação de enantiômeros.

A legislação vigente no Brasil para a validação de métodos analíticos é a resolução da ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003, que estabelece um conjunto específico de parâmetros de desempenho analítico. Esta resolução não

possui informações específicas para realizar validação de metodologias analíticas de separação enantiomérica.

Os parâmetros de desempenho analítico que devem ser avaliados de acordo com a RE nº 899 são os seguintes:

- Especificidade (e seletividade);
- Linearidade;
- Intervalo;
- Precisão;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Exatidão;
- Robustez.

Esta resolução estabelece quatro categorias de testes, conforme apresentado na Tabela 4. Com base na finalidade de cada categoria, são estabelecidos quais parâmetros necessitam ser avaliados para a validação da metodologia. A categoria I inclui os testes para quantificação de princípio ativo em produtos farmacêuticos e matérias-primas. A categoria II inclui os testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas. No caso de ensaio limite, o limite de detecção possui maior importância, uma vez que há possibilidade do analito estar presente em pequena quantidade. A categoria III inclui os testes de performance do produto como, por exemplo, dissolução e liberação do ativo. Os parâmetros a serem avaliados dependem da natureza do teste a ser realizado. A categoria IV inclui testes de identificação e são realizados para assegurar a identidade do analito na amostra. O método será considerado validado com base na avaliação conjunta dos testes realizados (BRASIL, 2003)

Tabela 4 – Parâmetros para a validação de métodos analíticos de acordo com a RE nº 899

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão - repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; ** se houver comprovação da repetibilidade, não é necessária a comprovação da precisão intermediária

De acordo com o ICH e com o FDA, métodos podem precisar ser revalidados, ou seja, serem parcialmente validados, em casos como mudança na rota de síntese do fármaco, mudança na composição do produto acabado e/ou em casos de mudanças no procedimento analítico. O grau de revalidação do método irá variar conforme a natureza das alterações realizadas. Em alguns casos pode ser necessário que o método seja validado novamente (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005).

Com o intuito de esclarecer quando é necessário validar totalmente ou parcialmente um método, a Farmacopéia Americana criou uma lista com características de performance para cromatografia líquida e gasosa com variações consideradas como um ajuste do sistema, onde não é necessário que o método seja validado totalmente, desde que a adequabilidade do sistema continue aceitável. Entre os parâmetros citados nestas listas, estão: comprimento da coluna, diâmetro interno, tamanho de partícula, vazão, temperatura da coluna, volume de injeção, pH, concentração de sal e composição da fase móvel (USP 33, 2010).

Realizar-se-á uma breve abordagem sobre os parâmetros de validação de metodologia analítica baseada em guias e legislações disponíveis sobre o tema, com ênfase em análises por CLAE e por CE.

4.8.1. Especificidade / Seletividade

Os termos especificidade e seletividade às vezes são empregados como palavras sinônimas. Por definição, quando um método instrumental de separação produz resposta para uma única substância de interesse, este método pode ser dito como específico e quando um método instrumental de separação produz resposta para diversos compostos químicos, com uma característica comum, ele pode ser chamado de seletivo (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Em validações de metodologia analítica na área farmacêutica, o termo especificidade é o mais utilizado.

A especificidade é a capacidade que um método possui de medir inequivocamente um composto na presença de outros componentes, como por exemplo, componentes da matriz (excipientes), impurezas, produtos de degradação, subprodutos de síntese, contaminantes, etc (BRASIL, 2003). Ou seja, é avaliado se o método sofre algum tipo de influência em relação à presença de substâncias que poderiam interferir na determinação do analito.

A especificidade ou seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental. A especificidade ou seletividade de um método é obtida a partir da otimização das condições analíticas (temperatura da coluna, fase móvel, fase estacionária, etc). Para comprovar que um método cromatográfico seja dito como específico ou seletivo, realizam-se análises com injeção de soluções contendo o analito e sem conter o analito. A matriz da amostra também é chamada de placebo, e refere-se à mistura de todas as substâncias que compõem a amostra, com exceção do analito de interesse, nas mesmas condições previstas para a solução teste. Normalmente são realizadas análises com soluções de: branco ou diluente (solvente da amostra); fase móvel; padrão do analito puro; analito mais placebo; placebo; amostra; produtos de degradação identificados e não identificados; produtos de degradação por estresse mais analito; placebo oriundo de estudos de degradação por estresse; amostra oriunda de estudos de degradação; subprodutos de síntese (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

A especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos do analito contaminado com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas. Quando não há disponibilidade de interferentes (impureza ou padrões dos produtos de degradação), alguns autores sugerem que seja avaliada a capacidade de medição do analito por diferentes métodos, técnicas ou por meio de variações nas condições instrumentais, desde que o segundo método esteja devidamente caracterizado (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002).

Nos estudos de degradação por estresse, o placebo e a amostra são submetidos a condições que favoreçam a formação de produtos de decomposição. Os testes de estresse geralmente realizados são fotólise, exposição ao calor, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação (BRASIL, 2003).

O método é considerado específico se os cromatogramas das soluções que não contêm analito não possuem resposta na área de eluição dos picos de interesse e se a resposta dos picos de interesse não for afetada pelos demais solutos testados. Recomenda-se ainda, comprovar a pureza dos picos para demonstrar que o pico cromatográfico corresponde a uma única substância utilizando, por exemplo, duas colunas com características diferentes, ou utilizando detectores seletivos como detector de arranjo de diodos (DAD) ou espectrômetro de massas (LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

O DAD, por ser um método não destrutivo da amostra, pode ser colocado em linha com espectrômetro de massas, assegurando assim mais uma informação na verificação da pureza do pico eluído. O tempo de retenção, juntamente com os espectros de massas e UV-Vis praticamente garantem a determinação da pureza e identidade do pico em análise. Obtendo-se o espectro de massas do pico e comparando-o com o seu padrão analítico é possível determinar, na maioria dos casos, a pureza do pico. Algumas exceções são causadas por isômeros, principalmente ópticos, os quais geralmente possuem o mesmo espectro de massas. Porém, normalmente os seus tempos de retenção são diferentes quando analisados em colunas quirais, auxiliando assim na confirmação da identidade do pico (LANÇAS, 2004). Devido ao alto custo do espectrômetro de massas, normalmente este tipo de detector não está disponível para análise de rotina laboratorial. A

utilização de DAD, junto aos demais testes de especificidade é considerada como indicativo satisfatório da especificidade do método (BARROS NETO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

A determinação da pureza dos picos torna-se ainda mais importante nas análises que envolvem diversos compostos. Caso seja observada resposta em cromatogramas de soluções onde o analito não estava presente, testes adicionais devem ser realizados para mostrar o grau de significância da interferência e as respostas podem ser avaliadas pelo teste estatístico de análise de variância (ANOVA) (BARROS NETO et al., 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

4.8.2. Linearidade

Linearidade é a capacidade que a metodologia analítica tem de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra, em um determinado intervalo (BRASIL, 2003). Na prática, a linearidade é determinada por intermédio de curvas de calibração, seguidos de tratamento estatístico (LANÇAS, 2004). A linearidade deve ser avaliada visualmente através de um gráfico de sinal *versus* a concentração do padrão, onde o eixo horizontal (eixo “x”) deve corresponder à concentração do padrão e o eixo vertical (eixo “y”) deve corresponder à altura ou área dos picos de interesse. O gráfico deve ser traçado sem incluir o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002; RIBANI et al., 2004).

Uma variação desse procedimento consiste em adicionar um padrão interno a cada solução do padrão analítico, com o intuito de corrigir possíveis desvios durante o procedimento como, por exemplo, variação no volume de injeção entre uma concentração e outra. Outro exemplo de variação de procedimento analítico que pode ser realizada consiste em adicionar padrão analítico à matriz, a fim de eliminar possíveis interferentes presentes na matriz (BARROS NETO et al., 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

O número mínimo de pontos geralmente aceitos para gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos e devem sempre ser realizadas em triplicata. Para análises cromatográficas, é altamente recomendado que a resposta varie em proporção linear em relação à variação da concentração, obedecendo assim à lei de Beer. A resposta média obtida para cada nível de concentração injetada deve ser calculada e comparada com a resposta relativa obtida para o nível médio de concentração (100%). Isso permite avaliar o quanto a resposta de cada uma das concentrações analisadas desvia do ponto central, permitindo identificar se há algum tipo de tendência no método (BARROS NETO et al., 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

Os picos devem sempre ser integrados do mesmo modo para todos os cromatogramas. Caso o gráfico possua relação linear aparente, os resultados obtidos devem ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo “y”, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão e desvio padrão relativo. A condição ideal do gráfico é que ele obedeça à equação de primeira ordem do modelo linear:

$$y = ax + b$$

Equação 3 – Equação de primeira ordem

Onde:

y = variável dependente;

x = variável independente;

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear.

O coeficiente angular (a) expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos e o coeficiente linear (b) expressa a intersecção do gráfico com os eixos. O gráfico deve apresentar perfil aleatório, randômico, mostrando que sua variabilidade é a mesma para toda a faixa de concentração avaliada na linearidade (BARROS NETO et al., 2003). Caso não haja relação linear, deve-se realizar transformação matemática dos dados obtidos (BRASIL, 2003).

A relação entre as variáveis “x” e “y” são determinadas pelo cálculo do coeficiente de determinação (R^2), que mostra o grau de variabilidade do método e do coeficiente de correlação ($r = \sqrt{R^2}$). O coeficiente de correlação “r” permite estimar a qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Pela RE nº 899, este valor deve ser igual ou maior a 0,99 (BRASIL, 2003).

A avaliação da linearidade do método deve ser condizente com o método de padronização, quando for utilizado padrão interno ou padrão externo. Se a metodologia for utilizada para análise em matriz complexa ou matriz biológica e algum método de adição de padrão à matriz for utilizado durante as análises, este fator deve ser levado em consideração durante a realização dos testes de linearidade (BARROS NETO et al., 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

A partir da inclinação do gráfico de calibração é possível determinar a sensibilidade. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação, maior será a sensibilidade do método (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1993). Deve-se cuidar para não confundir faixa dinâmica com a faixa de linearidade de um método, pois a faixa dinâmica é mais ampla que a faixa linear, conforme mostrado na Figura 9. O gráfico exibido nesta figura normalmente é feito utilizando escala logarítmica em ambos os eixos.

Figura 9 – Determinação gráfica da faixa de linearidade e da faixa dinâmica em cromatografia, de acordo com a IUPAC (adaptado) (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1993)

4.8.3. Intervalo

O intervalo compreende a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, sendo a faixa derivada dos parâmetros de linearidade, exatidão e precisão e conforme a finalidade do método. Recomenda-se avaliar concentrações igualmente distribuídas na faixa de concentração e as leituras devem ser realizadas em triplicata. Estas concentrações devem ser preparadas em concentração seriada conforme a faixa pretendida para uso do método. Os níveis de concentração normalmente avaliados são em relação à concentração teórica da solução teste de análise de rotina (100%). De acordo com a RE nº 899, as concentrações devem seguir os intervalos diferentes conforme o objetivo do ensaio, conforme exibido na Tabela 5 (BRASIL, 2003).

Tabela 5 – Limites percentuais de teor de analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos de acordo com a RE nº 899

Ensaio	Alcance
Quantificação do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando houver importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e de detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir – 20% sobre o menor valor e + 20% sobre o maior valor

O intervalo de aplicação corresponderá ao intervalo no qual o procedimento mostrou-se satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade.

Para testes de quantificação, a USP recomenda que seja avaliado entre 80 e 120% da concentração de teste (GROBUSCHEK et al., 2002).

4.8.4. Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é dividida em três categorias: repetibilidade ou precisão intra-corrida; precisão intermediária ou inter-corrida; reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002).

Em cromatografia, a precisão sempre é realizada através de injeções do padrão e não por injeções de amostras desconhecidas (LANÇAS, 2004). A precisão normalmente é expressa como desvio padrão relativo (DPR), também chamada de coeficiente de variação (CV), através da equação:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} * 100$$

Equação 4 – Desvio padrão relativo

Onde:

DPR = desvio padrão relativo;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

A RE nº 899 aceita DPR que não seja superior a 5%. O valor máximo aceitável para a metodologia deve ser definido levando-se em consideração o tipo

de metodologia, concentração do analito na amostra, tipo de matriz e finalidade do método (BRASIL, 2003).

4.8.4.1. Repetibilidade ou precisão intra-corrída

A repetibilidade avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo do mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, com o mesmo analista e instrumentação (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004). Em análises cromatográficas é importante avaliar a repetibilidade do tempo de retenção e área ou altura do pico. A repetibilidade do tempo de retenção é importante, pois na maioria das análises cromatográficas, ela é utilizada para confirmar a identidade do composto (análise qualitativa), enquanto que a área ou altura do pico são utilizadas para quantificar o analito. Repetibilidade com CV menor que 1% na área relativa em CLAE tem sido obtida quando se utiliza padrão interno para corrigir as flutuações no sistema de injeção (LANÇAS, 2004).

Pode-se utilizar fórmula matemática para estabelecer os critérios da repetibilidade, como:

$$r = t * \sqrt{2} * s_T$$

Equação 5 – Repetibilidade

Onde:

r = repetibilidade;

t = valor obtido na tabela de Student;

s_T = desvio padrão da repetibilidade.

O valor de *t* pode ser usado como aproximadamente 2, o que representa 95% de probabilidade na tabela *t* de Student. De acordo com esse procedimento, o valor adequado de repetições deve ser de pelo menos 20. Dependendo da análise, pode-se utilizar o valor mínimo de repetições. Pelo ICH e pela RE n° 899, é recomendado que se realize um mínimo de nove determinações contemplando todo o intervalo

linear do método, ou seja, triplicata de três concentrações baixa, média e alta ou seis determinações na concentração de trabalho correspondente a 100% (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005).

4.8.4.2. Precisão intermediária ou precisão inter-análise

A precisão intermediária avalia a concordância entre os resultados do mesmo laboratório obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou instrumentos diferentes (BRASIL, 2003). Esse tipo de teste pode ser utilizado para avaliar a contribuição relativa de cada fator na variabilidade do resultado final (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1993). Os documentos da ICH recomendam que as variáveis a ser estudadas sejam avaliadas conforme as circunstâncias em que o método será utilizado, sendo as variáveis mais comuns dias, analista e equipamento, não sendo necessária a avaliação destas variáveis de forma independente (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005).

A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).

4.8.4.3. Reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial

A reprodutibilidade representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, como, por exemplo, dos métodos farmacopéicos (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 1993). Para tal, utiliza-se o mesmo método, para a mesma amostra, porém em diferentes laboratórios e, conseqüentemente, por diferentes analistas e equipamentos (LANÇAS, 2004). A IUPAC aconselha a não tirar conclusões com menos de cinco laboratórios.

O desvio padrão normalmente apresentado é cerca de duas vezes maior que o desvio padrão apresentado pela repetibilidade. A principal função da reprodutibilidade é confirmar se uma metodologia pode ou não ser transferida para outros laboratórios gerando resultados aceitáveis dentro dos critérios previamente estabelecidos.

4.8.5. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato.

Os valores de limite de detecção e de limite de quantificação (LQ) normalmente são determinados teoricamente pela determinação da relação sinal/ruído da linha de base na região onde os analitos são eluídos. Normalmente se aceita como LD o valor que gere três vezes a relação sinal/ruído do sistema. Outro modo de estabelecer este limite é definir a massa ou concentração de analito que gere um sinal igual a três vezes o desvio padrão do ruído medido utilizando-se o branco, ao invés de considerar apenas o sinal do equipamento (EURACHEM, 1998; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002; LANÇAS, 2004; RIBANI et al.; 2004).

Este cálculo teórico deve ser utilizado como ponto de partida para realizar o teste prático de LD, pois o método pode não ser efetivamente capaz de detectar a concentração calculada de analito. Na prática, este valor é determinado como a menor concentração de analito que pode ser diferenciada do ruído do equipamento com segurança.

Assim, devem-se preparar soluções diluídas com concentração equivalente à calculada. Estas soluções devem ser analisadas e injetadas sequencialmente pelo menos seis vezes. Todos os cromatogramas devem ser analisados e, sempre que houver picos, os mesmos devem ser integrados. Se em todos os cromatogramas da solução correspondente à concentração do LD houver picos, deve-se avaliar se o valor obtido de relação sinal/ruído é próximo ao valor esperado. Se o valor

encontrado for próximo ao esperado, esta será a concentração correspondente ao LD do método. Caso contrário, deve-se realizar nova diluição com concentração maior ou menor de analito, até que sejam obtidos picos em todos os cromatogramas e que o valor de relação sinal/ruído seja próximo ao esperado (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

É importante salientar que a concordância entre os valores teórico e prático dos limites de detecção e de quantificação variam de acordo com o sistema cromatográfico empregado, da condição das lâmpadas do detector, fontes de ruído eletrônico e concentração da solução em análise. Quanto menor for a concentração do analito, menor será o grau de concordância entre os valores teóricos e práticos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; LANÇAS, 2004; RIBANI et al., 2004).

4.8.6. Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor quantidade de analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade determinada. A fidelidade, na prática, é aceita como um CV de até 10% e uma exatidão de + 10% ou -10%. Pode também ser definida utilizando-se a relação sinal/ruído com o branco como referência. Valores próximos a dez vezes o desvio padrão do ruído medido utilizando-se o branco também são aceitos (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002).

O cálculo teórico deve ser utilizado como ponto de partida para realizar o teste prático LQ do método, pois o método pode não ser efetivamente capaz de quantificar as concentrações calculadas de analito. Assim, devem-se preparar soluções diluídas com concentração equivalente à calculada. Estas soluções devem ser analisadas e injetadas sequencialmente pelo menos seis vezes. Todos os cromatogramas devem ser analisados e a resposta das injeções deve ser avaliada quanto a sua exatidão e precisão e se o valor da relação sinal ruído é próximo ao esperado. Se o resultado obtido demonstrar exatidão e precisão adequada e tiver

valor próximo ao esperado de relação sinal/ruído, então esta solução correspondente ao LQ do método. Caso contrário, deve-se realizar nova diluição com concentração maior ou menor de analito, até que sejam obtidos valores adequados de exatidão e precisão e que a relação sinal/ruído seja próximo ao valor esperado (EURACHEM, 1998; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2010; INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 2002; LANÇAS, 2004; RIBANI et al.; 2004).

4.8.7. Exatidão

A precisão e a exatidão são frequentemente confundidas. A precisão mede o quão semelhante são os resultados obtidos, enquanto que a exatidão mede o quanto o valor obtido se aproxima do valor real, ou seja, a precisão mede a capacidade de repetir ou reproduzir um determinado resultado, enquanto que a exatidão mede o desvio do valor prático em relação ao valor teórico.

A exatidão pode ser determinada pela equação:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} * 100$$

Equação 6 - Exatidão

Pode-se validar este parâmetro utilizando-se um método já estabelecido como referência ou então, utilizar o método de adição de uma quantidade conhecida de um padrão certificado do analito ao placebo, seguido de extração do analito e injeção no cromatógrafo. Esta resposta deve ser comparada com a da análise de padrão de referência dissolvido em um solvente puro.

Várias metodologias para determinação da exatidão estão disponíveis dependendo de sua aplicação (BRASIL, 2003):

Fármaco: a exatidão geralmente é determinada utilizando-se uma amostra certificada cuja concentração do analito de interesse seja conhecida. Outra maneira

de se validar a exatidão compreende a comparação da exatidão com resultados de métodos analíticos diferentes, como, por exemplo, CLAE e CE, demonstrando sua concordância.

Forma farmacêutica: pode-se validar a exatidão de uma forma farmacêutica utilizando-se o método do placebo contaminado. Quando as amostras de todos os componentes da formulação estão indisponíveis, se aceita realizar análise por meio de adição de padrão, assim é possível calcular a porcentagem de recuperação da quantidade do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor teórico, acrescida dos intervalos de confiança.

Impurezas: a exatidão para análise de impurezas pode ser realizada pelo método de adição de padrão, no qual são adicionadas quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou fármaco. Quando amostras de algumas impurezas e/ou produtos de degradação estão indisponíveis, se aceita realizar a comparação dos resultados com métodos analíticos diferentes desde que bem caracterizados.

É impossível obter uma exatidão boa se a precisão não for boa, porém apenas uma boa precisão não garante boa exatidão (LANÇAS, 2004). Valores baixos de exatidão são geralmente causados por erros sistemáticos (equipamentos não calibrados ou aferidos, interferentes na amostra, baixa recuperação na extração, medidas volumétricas incorretas, etc) que provocam tendências ou desvios nos resultados.

4.8.8. Robustez

É a medida da capacidade de que um método resiste a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003). A robustez permite avaliar a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo estabelecer as faixas de tolerância do método. Durante o desenvolvimento de uma

metodologia analítica, é importante considerar a avaliação da robustez, e caso seja constatado que o método é suscetível à variações nas condições analíticas, estas devem ser controladas e medidas de precaução devem ser incluídas no procedimento.

A influência dos fatores pode ser avaliada individualmente ou com vários fatores sendo alterados simultaneamente, sendo que no segundo caso é recomendado que se realize planejamento fatorial para posterior análise através de gráficos de superfície de resposta. O INMETRO recomenda que se utilize o teste de Youden para se determinar a robustez de um método, pois além de avaliar a robustez do mesmo, as influências são ordenadas nos resultados finais, indicando o tipo de influência de cada uma das variações realizadas.

No caso da cromatografia, vários parâmetros experimentais podem ser variados, porém devem estar dentro de uma faixa realista e a variação de resposta deve ser conhecida. Assim, pode-se especificar a faixa de tolerância para cada parâmetro do método dentro do qual ele é considerado robusto.

Quando a robustez é validada com mudança de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação sem haver alterações significativas nos resultados, pode-se dizer que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise (RIBANI et al., 2004).

A estabilidade das soluções pode ser avaliada no que se refere à capacidade das mesmas manterem suas características e propriedades físico-químicas inalteradas, quando submetidas a condições específicas de armazenamento.

4.8.9. Adequabilidade do sistema

O teste de adequabilidade do sistema (*system suitability*) não está descrito na RE nº 899, porém de acordo com as diretrizes do ICH, este teste é integrante de diversos procedimentos analíticos. Tal teste deve ser realizado antes e durante as análises a fim de garantir que o sistema está operando de maneira adequada, ou seja, que o sistema esteja gerando resultados com exatidão e precisão aceitáveis.

Os critérios de adequabilidade do sistema identificam critérios importantes que demonstram que o sistema funciona de acordo com as características estabelecidas durante a validação do método.

A adequabilidade do sistema pode ser abordada de dois modos diferentes. O primeiro modo considera que a resolução e a repetibilidade do sistema cromatográfico devam estar adequadas para a análise ser realizada. Assim, a adequabilidade é avaliada durante o desenvolvimento e validação do método. Os critérios selecionados são baseados no desempenho do método e são determinados durante a validação. O segundo modo considera o sistema como um todo e inclui o sistema cromatográfico, calibração e manutenção dos equipamentos e instrumentos utilizados em todo o procedimento analítico, dentro das especificações. Assim, a adequabilidade baseia-se no princípio de que o equipamento, os componentes eletrônicos, as operações analíticas e as amostras constituem um sistema integral que deve ser avaliado como um todo. A adequabilidade do sistema compreenderá, portanto, em uma verificação do sistema inteiro para garantir a sua qualidade antes ou durante a análise de amostras desconhecidas (HUME, 2007).

Os parâmetros avaliados na adequabilidade incluem fator de capacidade (k'), desvio padrão relativo (DPR) de injeções sequenciais, retenção relativa (seletividade), resolução (R_s), fator de cauda/assimetria (*tailing factor*) e número de pratos teóricos (N). O parâmetro de seletividade não é obrigatório desde que o valor de resolução tenha sido estabelecido. As recomendações para cada um destes parâmetros estão exibidas na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros de adequabilidade do sistema e recomendações (SNYDER et al., 1997; UNITED STATES, 2000)

Parâmetro	Recomendação
Fator de capacidade (k')	$k' > 2$. O pico deve estar bem separado dos demais picos e do tempo correspondente ao volume morto
DPR de injeções	$DPR \leq 1\%$ quando $n \geq 5$
Resolução (R_s)	$R_s > 1,5$ entre pico de interesse e interferente potencial mais próximo
Fator de cauda (T)	$T \leq 2,0$
Número de pratos teóricos (N)	$N > 2000$ para HPLC. Pode variar conforme o tempo de eluição dos picos

Vários fatores podem afetar os valores de seletividade, eficiência e fator de capacidade e, como consequência, podem alterar a resolução do sistema. A seletividade é controlada pelas características químicas da fase móvel, mas também pode ser afetada pelo pH da fase móvel e pelas características químicas da fase estacionária. A eficiência da coluna é determinada pelo tamanho médio e pela forma das partículas da fase estacionária (se são esféricas ou irregulares), além da uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, massa de amostra injetada, tempo de retenção do pico usado para o cálculo de N , comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extra coluna (como conexões, tubulações, célula, injetor e etc). O fator de capacidade, por sua vez, pode ser afetado pela polaridade da fase móvel e da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela porcentagem de recobrimento da fase estacionária (densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna.

4.8.10. Cálculos teóricos

A figura a seguir mostra os parâmetros utilizados para calcular a performance do sistema para uma análise onde há separação de dois componentes:

Figura 10 – Parâmetros considerados para adequabilidade do sistema

4.8.10.1. Fator de capacidade (k')

O fator de capacidade mede a localização do pico de interesse em relação ao volume morto. Deve-se evitar valores de retenção (K) próximos ao volume morto, pois neste caso ocorre pouca interação do composto analisado com a fase estacionária podendo ocorrer a coeluição com outro componente da amostra. Da mesma forma não se deve trabalhar com valores excessivamente altos de retenção, pois isto fará com que ocorra o alargamento dos picos. Este fator é calculado através da equação a seguir:

$$k' = \frac{t-t_0}{t_0}$$

Equação 7 - Fator de capacidade

4.8.10.2. Fator de separação ou Fator de seletividade (α)

O fator de separação ou fator de seletividade (α) compara a retenção de um componente (t_1) com a do outro componente (t_2) mais retido. A seletividade indica até que grau o sistema químico (depende da natureza química da coluna e da fase móvel) está resolvendo (separando) os componentes. Indica o quanto a fase estacionária ou a fase móvel interage com uma substância em comparação com outra. Valores de fator de separação maior que um indica que o sistema químico esta resolvendo (separando) os componentes.

$$\alpha = \frac{t_2}{t_1}$$

Equação 8 – Seletividade

4.8.10.3. Resolução (R_s)

A resolução avalia o grau de separação entre dois picos e pode ser calculada pela equação:

$$R_s = 2 * \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2}$$

Equação 9 - Resolução

Para que uma quantificação confiável seja realizada, os picos devem estar bem separados. A Figura 11 mostra a diferença de separação conforme o valor de resolução.

Figura 11 – Separação de picos indicada pela resolução (R_s) (adaptado) (UNITED STATES, 1994)

4.8.10.4. Fator de cauda/ assimetria (T)

A exatidão da quantificação é reduzida quando há picos com cauda devido a dificuldade em determinar em qual posição e tempo que o pico acaba para que possa ser calculada a área do mesmo. Este parâmetro pode ser calculado utilizando-se a equação:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Equação 10 – Fator de Assimetria

A Figura 12 indica os parâmetros considerados na equação acima mencionada.

Figura 12– Parâmetros considerados para o parâmetro de assimetria

4.8.10.5. Pratos teóricos (N)

A eficiência ou número de pratos teóricos (N) é uma medida de quanto o sistema incluindo injetor, tubulações, conexões, coluna, fase móvel, fase estacionária e detector está diluindo a banda do componente analisado durante a corrida cromatográfica. A eficiência (N) é uma medida do alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema, ou seja, avalia quantos picos podem ser localizados por unidade de tempo de corrida do cromatograma. O valor de N pode ser calculado pela equação a seguir:

$$N = 16 * \left(\frac{t}{W} \right)^2$$

Equação 11 - Pratos teóricos

O valor de N é constante para cada pico em um cromatograma com um determinado conjunto de condições operacionais. Parâmetros que podem afetar o número de pratos teóricos incluem posição do pico, tamanho das partículas da coluna, vazão da fase móvel, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel e peso molecular do analito.

4.8.11. Fatores que podem afetar a adequabilidade do sistema

Vários fatores podem afetar os valores de seletividade, eficiência e fator de capacidade e, como consequência, podem alterar a resolução do sistema. A seletividade é controlada pelas características químicas da fase móvel, mas também pode ser afetada pelo pH da fase móvel e pelas características químicas da fase estacionária. A eficiência da coluna é determinada pelo tamanho médio e pela forma das partículas da fase estacionária (se são esféricas ou irregulares), além da uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, massa de amostra injetada, tempo de retenção do pico usado para o cálculo de N , comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extra coluna (como conexões, tubulações, célula, injetor e etc). O fator de capacidade, por sua vez, pode ser afetado pela polaridade da fase móvel e da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela percentagem de recobrimento da fase estacionária (densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna.

5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1. Materiais

5.1.1. Reagentes e solventes

Reagentes e solventes de grau cromatográfico:

- Acetonitrila (ACN), grau cromatográfico, Merck®;
- Etanol (EtOH), grau cromatográfico, Merck®;
- Metanol (MeOH), grau cromatográfico, Merck®;
- Isopropanol (IPA), grau cromatográfico, Merck®;
- Hexano(HEX), grau cromatográfico, Merck®;
- Água ultra pura (Millipore®).

Reagentes e solventes de grau analítico:

- Ácido acético glacial (CH_3COOH), grau analítico, Merck®;
- Ácido ortofosfórico (H_3PO_4), grau analítico, J. T. Baker;
- Acetato de amônio, grau analítico, Merck®;
- Dietilamina (DEA), grau analítico, Merck®;
- Perclorato de potássio (KClO_4), grau analítico, Sigma-Aldrich Co.;
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), grau analítico, J. T. Baker;
- Hidróxido de sódio (NaOH), grau analítico, J. T. Baker;
- Ácido clorídrico (HCl), grau analítico, J. T. Baker;
- Trietilamina (TEA), grau analítico, Merck®.

Seletores quirais para eletroforese capilar:

- β -ciclodextrina hidratada, Sigma-Aldrich Co.;
- β -ciclodextrina sulfatada sódica, Sigma-Aldrich Co.;
- 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, Sigma-Aldrich Co.;

5.1.2. Substâncias químicas de referência

Foram empregados como substâncias químicas de referência fármacos de misturas racêmicas de cloridrato de esmolol e de cloridrato de sotalol, que foram gentilmente cedidos por laboratórios farmacêuticos.

5.1.3. Medicamentos

- Produto farmacêutico comercial à base de cloridrato de esmolol, na apresentação de solução injetável de 250 mg/mL.

- Produtos farmacêuticos comerciais à base de cloridrato de sotalol, na apresentação de comprimidos de 160 e 120 mg.

As amostras foram identificadas por números e os nomes dos fabricantes foram substituídos por letras, conforme listados na Tabela 7.

Tabela 7 - Amostras de esmolol e sotalol selecionadas para o estudo

Amostra	Laboratório	Substância	Forma farmacêutica	Dosagem
1	A	Cloridrato de esmolol	Solução injetável	250mg/mL
2	B	Cloridrato de sotalol	Comprimido	160 mg
3	C	Cloridrato de sotalol	Comprimido	120 mg

5.1.4. Equipamentos

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu (Class-VP) equipado com degaseificador “in line”, com duas bombas binárias e injetor. Detector UV-Vis SPD-M 10Avp do tipo DAD;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Agilent (1100 Series) equipado com degaseificador “in line”, com uma bomba quaternária e injetor automático. Detector UV-Vis;

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Waters (Alliance e2695) equipado com degaseificador “in line”, com quatro bombas e injetor automático. Detector UV-Vis;
- Sistema de eletroforese capilar da marca Beckman PACE/MDQ, equipado com detector UV-VIS do tipo DAD; capilar para eletroforese de 50 ou 75 µm de diâmetro interno;
- Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo UV-1601 equipado com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e acoplado a computador;
- Aparelho para determinação de faixa de fusão, marca Stuart Scientific, modelo SMP1, equipado com termômetro calibrado do tipo coluna de mercúrio, com escala entre - 10 °C e 360 °C, com resolução de 1 °C ;
- Medidor de pH, marca Digimed, modelo DM-21, equipado com eletrodo combinado de pH, marca Digimed, modelo DME-CV1;
- Aparelho de ultrassom;
- Balança analítica com precisão de quatro casas decimais;
- Membranas filtrantes descartáveis Millex HV 0,45 µm, membrana Durapore® PVDF, 13 mm diâmetro;
- Materiais de laboratório para análise, tais como balões volumétricos, pipetas volumétricas, micropipetas, provetas, béqueres, tubos de ensaios, etc.;
- Coluna quiral Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm d.i) carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil em partículas de sílica de 10 µm (*Chiral Technologies, Inc. PA, USA*);
- Coluna quiral Chiralcel OD® (250 x 10,0 mm d.i) carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil em partículas de sílica de 10 µm (*Chiral Technologies, Inc. PA, USA*);
- Coluna quiral Chiralcel OD-RH® (150 x 4,6 mm d.i) carbamato de celulose tris-3,5-dimetilfenil em partículas de sílica de 5 µm (*Chiral Technologies, Inc. PA, USA*);
- Coluna quiral (S)-α-Burke-2® (250 x 4,6 mm d.i) derivada de dimetil-N-3,5-dinitrobenzoil-α-amino-2,2-dimetil-4-pentenilfosfonato, ligada covalentemente a partículas de sílica gel esféricas de tamanho 5 µm, do tipo mercaptopropil (*Regis Technologies Inc. Illinois, USA*);
- Coluna quiral Whelk-O-1® (250 x 4,6 mm d.i) derivada de 4-(3,5-dinitro benzamida) tetrahidrofenantreno, ligada covalentemente a partículas de sílica gel esféricas de tamanho 5 µm (*Regis Technologies Inc. Illinois, USA*).

5.1.5. “Softwares”

- Sistema de aquisição e processamento de dados para CLAE (Class VP, Shimadzu);
- Sistema de aquisição e processamento de dados para CLAE (ChemStation, Agilent);
- Sistema de aquisição e processamento de dados para CLAE (Empower, Waters);
- Software para aquisição e tratamento de dados para CE (32 Karat™ v. 8.0).

5.2. Métodos

5.2.1. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

No intuito de se obter o espectro de ultravioleta das amostras e determinar o comprimento de onda com máxima absorção em função do meio no qual a amostra foi diluída para posterior análise por CLAE e eletroforese capilar, foi realizada uma varredura entre pH 2,0 e 11,0 utilizando água ultra pura tamponada com H_3PO_4 ou NaOH e também em solução com metanol, etanol e hexano do cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol.

Para a obtenção dos espectros de absorção no ultravioleta de cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol foram pesados, separadamente, exatamente 10 mg de cada um dos fármacos. Cada um dos fármacos foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água ultra pura, onde se obteve solução estoque com concentração de fármaco igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$. No caso das análises com solvente orgânico (metanol, etanol, hexano), as soluções estoques foram preparadas com os respectivos solventes.

Para obter a concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$, foram transferidas alíquotas de 250 μL da solução estoque de cloridrato de esmolol para balões volumétricos de 25 mL. Os balões volumétricos foram completados com metanol; etanol; hexano; ou

água ultra pura tamponada (com H_3PO_4 ou NaOH) em pH 2,0; pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0; pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0; pH 9,0; pH 10,0; pH 11,0. Este mesmo procedimento foi realizado com a solução estoque de cloridrato de sotalol.

Aguardou-se 15 minutos após a preparação das soluções com água tamponada e realizou-se nova leitura do pH de cada uma das soluções, sendo que o pH foi ajustado, quando necessário. Somente após a esta verificação de pH, as amostras foram submetidas à leitura.

Os espectros de ambos os fármacos foram coletados na região correspondente ao ultravioleta, com varredura compreendida entre 190 nm e 400 nm, inclusive. A aquisição de dados foi feita com leitura a cada 1 nm e intervalo de 2 segundos. O mesmo diluente utilizado para preparar as amostras foi utilizado como branco para as leituras respectivas. Todas as leituras foram realizadas em duplicata.

5.2.2. Determinação do ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão foi realizada para fins de caracterização das amostras, bem como para determinar seu comportamento frente a aquecimento, caso durante a fase de obtenção dos enantiômeros puros fosse necessário submeter as frações separadas a algum tipo de aquecimento para evaporar os solventes.

As amostras foram inseridas em capilar de vidro até formar uma coluna de 0,5 cm de altura. Realizou-se aquecimento das amostras até que as mesmas passassem para o estado líquido utilizando-se aparelho para determinação de faixa de fusão, com termômetro com resolução de 1 °C.

As análises para cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol foram realizadas em triplicata.

5.2.3. Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo de cloridrato de esmolol por CLAE

Foram desenvolvidos métodos analíticos para análise quantitativa dos enantiômeros do esmolol através de CLAE em fase normal e reversa, utilizando as FEQs analíticas Chiralcel OD[®] e Chiralcel OD-RH[®], respectivamente. Todas as condições testadas durante o desenvolvimento analítico levaram em consideração o limite máximo e seguro de pressão e vazão que a coluna pode ser submetida.

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do esmolol, foram preparadas diversas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de diferentes solventes e soluções. Reagentes com caráter básico foram empregados em pequenas quantidades para melhorar os formatos dos picos e assim se obter uma separação mais eficiente. Todas as fases móveis testadas foram previamente filtradas e sonicadas em banho ultrassônico. No caso de misturas de solventes e soluções em proporções definidas, as mesmas foram realizadas no próprio cromatógrafo, assim como a degaseificação dos solventes e soluções.

Todas as soluções finais de amostra e padrões foram filtradas através de membrana Millipore[®] 0,45 µm de tamanho de poro, com diâmetro de 13 mm, não estéril (Millipore Corporation, MA, USA) antes de serem analisadas.

Ensaio utilizando fase normal em escala semi-preparativa para o cloridrato de esmolol foram realizados com o intuito de coletar as frações referentes a cada um dos enantiômeros para serem utilizados posteriormente como substância química de referência.

5.2.3.1. Desenvolvimento de método de separação utilizando fase reversa

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando como fase estacionária quiral uma coluna do tipo tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose (Chiralcel OD-RH[®]), com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partícula com 5 µm. As amostras foram analisadas a 25 °C, com volumes de injeção variando entre 5 e 20 µL. A vazão foi variada entre 0,1 e 0,9 mL.min⁻¹. A detecção do cloridrato de esmolol foi feita a 220 nm, 230 nm e 275 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado. Foram realizados planejamentos fatoriais para otimização do método analítico em desenvolvimento.

5.2.3.2. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 10 mg de cloridrato de esmolol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 10 mL contendo metanol ou água ultra pura para se obter a concentração de 1000 µg de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições com metanol ou água ultra pura para balões volumétricos para se obter soluções na concentração de 100 e 200 µg/mL.

5.2.3.3. Preparação das fases móveis

Foram empregados dois sais diferentes: fosfato de sódio monobásico e perclorato de potássio. Tais sais foram escolhidos com base na força iônica dos mesmos (TACHIBANA, 2001).

Nos ensaios compreendidos entre número 43 e 51, variou-se a concentração de fosfato de sódio (50 mM; 100 mM), pH (pH 2; pH 7) e porcentagem de fase orgânica (20%; 60%). Nos ensaios compreendidos entre número 52 e 60 foram

variados os mesmos parâmetros dos ensaios 43 a 51, porém utilizando perclorato de potássio. A fase orgânica utilizada para ambos foi composta por uma mistura de ACN : MeOH, na proporção de 70:30. A vazão foi fixada em 0,5 mL.min⁻¹ e a temperatura em 25 °C. Em ambos os casos realizou-se ainda leitura utilizando-se os pontos intermediários dos parâmetros variados, ou seja, utilizando 75 mM, pH 4,5 e 40% de fase orgânica.

A Tabela 8 apresenta as condições cromatográficas testadas durante o desenvolvimento de metodologia para separação do cloridrato de esmolol por CLAE em fase reversa.

Tabela 8 - Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD-RH®

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹) ¹⁾
1	200	10	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 3,0 : ACN (60:40)	0,5
2	200	10	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 3,0 : ACN (50:50)	0,5
3	200	10	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 3,0 : ACN (20:80)	0,5
4	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 3,0 : MeOH (20:80)	0,6
5	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 3,0 : MeOH (20:80)	0,7
6	200	20	EtOH (100)	0,64
7	200	10	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 3,0 : EtOH (30:70)	0,3
8	200	10	IPA (100)	0,3
9	200	10	EtOH (100)	0,3
10	200	10	EtOH (100)	0,65
11	200	20	EtOH : água ultra pura (95:5)	0,4
12	200	10	IPA (100)	0,3
13	200	10	IPA (100)	0,2
14	200	10	IPA (100)	0,1
15	200	10	MeOH (100)	0,9
16	200	10	MeOH (100)	0,5
17	200	10	EtOH (100)	0,6
18	200	10	EtOH (100)	0,4
19	200	10	EtOH (100)	0,2
20	200	10	EtOH : MeOH (90:10)	0,5
21	100	10	EtOH (100)	0,56

Tabela 8 – Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD-RH® (continuação)

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
22	100	5	EtOH (100)	0,56
23	100	5	EtOH (100)	0,3
24	200	10	EtOH : MeOH (80:20)	0,6
25	200	5	EtOH : MeOH (80:20)	0,6
26	200	10	EtOH : DEA (100:0,2)	0,5
27	200	10	EtOH : DEA (100:0,2)	0,3
28	200	10	EtOH : MeOH : DEA (90:10:0,18)	0,5
29	200	10	EtOH : MeOH : DEA (80:20:0,16)	0,5
30	200	10	EtOH : MeOH : DEA (80:20:0,16)	0,3
31	200	10	EtOH : MeOH : DEA (60:40:0,12)	0,5
32	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (80:20)	0,5
33	200	10	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (80:20)	0,5
34	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (40:60)	0,5
35	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (35:65)	0,5
36	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (45:55)	0,5
37	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (50:50)	0,6
38	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (50:50)	0,5
39	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (55:45)	0,5
40	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 6,9 : ACN (40:60)	0,5
41	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 6,9 : ACN (80:20)	0,5
42	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7,0 : EtOH (48:40:12)	0,5
43	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7,0 : EtOH (42:40:18)	0,5
44	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7,0 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
45	200	20	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,0 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
46	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7,0 : EtOH (42:40:18)	0,5
47	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,1 : EtOH (42:40:18)	0,5
48	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,1 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
49	200	20	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 2,1 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
50	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 2,1 : EtOH (42:40:18)	0,5
51	200	20	NaH ₂ PO ₄ 75 mM, pH 4,42 : ACN : EtOH (60:28:12)	0,5

Tabela 8 – Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD-RH® (continuação)

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
52	200	20	KClO ₄ 75 mM, pH 4,52 : ACN : EtOH (60:28:12)	0,5
53	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,12 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
54	200	20	ACN : KClO ₄ 100 mM, pH 2,12 : EtOH (42:40:18)	0,5
55	200	20	KClO ₄ 50 mM, pH 2,08 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
56	200	20	ACN : KClO ₄ 50 mM, pH 2,08 : EtOH (42:40:18)	0,5
57	200	20	ACN : KClO ₄ 50 mM, pH 6,96 : EtOH (42:40:18)	0,5
58	200	20	KClO ₄ 50 mM, pH 6,96 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
59	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 6,90 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
60	200	20	ACN : KClO ₄ 100 mM, pH 6,90 : EtOH (42:40:18)	0,5
61	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,12 : ACN : EtOH (60:28:12)	0,5
62	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,12 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
63	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,02)	0,5
64	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,02)	0,6
65	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,04)	0,5
66	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,04)	0,6
67	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA : CH ₃ COOH (80:20:0,04:0,04)	0,5
68	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA : CH ₃ COOH (80:20:0,04:0,04)	0,6
69	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,06 : ACN : DEA (80:20:0,1)	0,5
70	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,06 : ACN : DEA (62:38:0,1)	0,5
71	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,06 : ACN : DEA (67:33:0,1)	0,5
72	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,1)	0,5
73	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,18 : ACN : DEA (80:20:0,2)	0,5
74	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,2)	0,5
75	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA : CH ₃ COOH (80:20:0,2:0,2)	0,5

5.2.3.4. Desenvolvimento de método de separação utilizando fase normal

5.2.3.4.1. Desenvolvimento de método utilizando escala analítica

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando coluna do tipo tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose (Chiralcel OD[®]), com 250 mm de comprimento x 4,6 mm diâmetro interno, 10 µm partícula como fase estacionária quiral. As amostras foram analisadas a 25 °C, com volume de injeção de 20 µL. A vazão foi variada entre 0,2 e 1,3 mL.min⁻¹. A detecção do cloridrato de esmolol foi feita a 220 nm, 225 nm, 230 nm e 275 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado.

5.2.3.4.2. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 10 mg de cloridrato de esmolol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 25 mL contendo etanol para se obter a concentração de 400 µg de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições para balões volumétricos com etanol para se obter soluções na concentração de 200 µg/mL.

5.2.3.4.3. Preparação das fases móveis

A Tabela 9 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 9 - Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD®

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
1	200	20	Hex : EtOH (99:1)	1,0
2	200	20	Hex : EtOH (90:10)	1,0
3	200	20	Hex : EtOH (80:20)	1,0
4	200	20	Hex : EtOH (70:30)	0,8
5	200	20	Hex : EtOH (50:50)	0,6
6	200	20	EtOH : Hex (80:20)	0,5
7	200	20	EtOH : Hex (90:10)	0,5
8	200	20	EtOH (100)	0,4
9	200	20	EtOH : Hex (90:10)	0,2
10	200	20	EtOH : Hex (80:20)	0,3
11	200	20	EtOH : MeOH : Hex (64:16:20)	0,6
12	200	20	EtOH : MeOH : Hex (72:18:10)	0,5
13	200	20	EtOH : MeOH : Hex (40:40:20)	0,7
14	200	20	EtOH : Hex : MeOH (72:20:8)	0,5
15	200	20	MeOH : Hex : EtOH (64:20:16)	0,8
16	200	20	EtOH : Hex : MeOH (64:20:16)	0,6
17	200	20	EtOH : Hex : DEA (80:20:0,16)	0,5
18	200	20	EtOH : Hex : DEA (70:30:0,14)	0,5
19	200	20	Hex : EtOH : DEA (50:50:0,1)	0,7
20	200	20	Hex : EtOH : DEA (70:30:0,06)	0,9
21	200	20	Hex : EtOH : DEA (90:10:0,2)	1,0
22	200	20	Hex : EtOH : DEA (90:10:0,2)	1,3
23	200	20	Hex : EtOH : DEA (90:10:0,2)	1,0
24	200	20	Hex : EtOH : DEA (80:20:0,2)	1,0
25	200	20	Hex : EtOH : DEA (80:20:0,2)	1,1
26	200	20	Hex : EtOH : DEA (70:30:0,2)	0,8
27	200	20	Hex : EtOH : DEA (70:30:0,2)	0,9
28	200	20	Hex : EtOH : DEA (75:25:0,2)	1,0
29	200	20	Hex : EtOH : DEA (77:23:0,184)	1,0

Tabela 9 – Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol utilizando coluna Chiralcel OD® (Continuação)

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
30	200	20	Hex : EtOH : DEA (85:15:0,2)	1,0
31	200	20	Hex : EtOH : DEA (83:17:0,153)	1,0
32	200	20	Hex : EtOH : DEA (84:16:0,144)	1,0
33	200	20	Hex : EtOH : DEA (82:18:0,162)	1,0
34	200	20	Hex : EtOH : DEA (81:19:0,171)	1,0
35	200	20	Hex : EtOH : DEA (74:26:0,208)	1,0
36	200	20	Hex : EtOH : DEA (73:27:0,216)	1,0
37	200	20	Hex : EtOH : DEA (72:28:0,224)	1,0
38	200	20	Hex : EtOH : DEA (71:29:0,232)	1,0
39	200	20	Hex : EtOH : DEA (76:24:0,192)	1,0

5.2.3.5. Desenvolvimento de método utilizando escala semi-preparativa

Foram avaliadas condições utilizando hexano, etanol, isopropanol, com e sem os modificadores orgânicos de dietilamina ou trietilamina, com o intuito se obter a maior quantidade de massa possível e menor perda de resolução a cada injeção de cloridrato de esmolol racêmico. Utilizou-se coluna do tipo tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose (Chiralcel OD®) 250 mm de comprimento x 10 mm diâmetro interno, 10 µm partícula como fase estacionária quiral. As amostras foram analisadas a 25 °C, com volume de injeção variável. As vazões testadas foram de 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mL.min⁻¹. A detecção do cloridrato de esmolol foi feita a 220 nm, 225 nm, 230 nm e 275 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado.

Os métodos utilizados para coletar as frações dos enantiômeros foram escolhidos com base no rendimento de analito recuperado. As frações coletadas devem ser purificadas para serem utilizadas como substância química de referência na validação dos métodos analíticos.

5.2.3.5.1. Preparação da amostra

Amostra 1: Foram pesados exatamente 300 mg de cloridrato de esmolol racêmico e diluído em 1 mL de etanol para se obter uma solução saturada. Esta solução foi homogeneizada e agitada em banho ultrassônico por 10 minutos.

Amostra 2: Foram pesados exatamente 150 mg de cloridrato de esmolol racêmico e diluído em 10 mL de etanol. Esta solução foi homogeneizada e agitada em banho ultrassônico por 10 minutos.

Amostra 3: Foram pesados exatamente 100 mg de cloridrato de esmolol racêmico e diluído em 10 mL de etanol. Esta solução foi homogeneizada e agitada em banho ultrassônico por 10 minutos.

5.2.3.5.2. Preparação das fases móveis

Durante o desenvolvimento do método para a separação dos enantiômeros do esmolol em fase normal utilizando coluna quiral Chiralcel OD® em escala semi-preparativa, foram preparadas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de hexano, etanol e isopropanol. Reagentes com caráter básico foram empregados em pequenas quantidades.

5.2.4. Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo de cloridrato de sotalol por CLAE

Foram desenvolvidos métodos analíticos para análise quantitativa dos enantiômeros do sotalol através de CLAE em fase normal e reversa, utilizando FEQs analíticas do tipo Chiralcel OD-RH[®] e Chiralcel OD[®].

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do sotalol, foram preparadas diversas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de diferentes solventes e soluções. Reagentes com caráter básico foram empregados em pequenas quantidades para melhorar os formatos dos picos e assim se obter uma separação mais eficiente. Todas as fases móveis testadas foram previamente filtradas e sonicadas em banho ultrassônico. No caso de misturas de solventes e soluções em proporções definidas, as mesmas foram realizadas no próprio cromatógrafo, assim como a degaseificação dos solventes e soluções.

Todas as soluções finais de amostra e padrões foram filtradas através de membrana Millipore[®] 0,45 µm de tamanho de poro, com diâmetro de 13 mm, não estéril (Millipore Corporation, MA, USA) antes de serem analisadas.

5.2.4.1. Desenvolvimento de método de separação utilizando fase reversa

5.2.4.1.1. Desenvolvimento de método de separação utilizando Chiralcel OD-RH[®]

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando como fase estacionária quiral uma coluna do tipo tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose (Chiralcel OD-RH[®]), com 150 mm de comprimento,

4,6 mm diâmetro interno e partícula de 5 μm . As amostras foram analisadas a 25 °C, com volumes de injeção de 20 μL . A vazão foi variada entre 0,3 e 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A detecção do cloridrato de sotalol foi feita a 227 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado. Foram realizados planejamentos fatoriais durante o desenvolvimento do método analítico.

5.2.4.1.1.1. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 10 mg de cloridrato de sotalol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 10 mL contendo metanol para se obter a concentração de 1000 μg de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições para balões volumétricos com metanol para se obter soluções na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.2.4.1.1.2. Preparação das fases móveis

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do sotalol em fase reversa utilizando coluna quiral Chiralcel OD-RH® foram preparadas diversas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de diferentes solventes e soluções. Reagentes com caráter básico foram empregados em pequenas quantidades.

Os sais utilizados para os ensaios de cloridrato de sotalol em fase reversa foram os mesmos utilizados nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa.

Nos ensaios de número 6 a 14 variou-se a concentração de fosfato de sódio (50 mM; 100 mM), pH (pH 2; pH 7) e porcentagem de fase orgânica (20%; 60%). Nos ensaios de número 15 a 23 foram variados os mesmos parâmetros dos ensaios de número 6 a 14, porém utilizou-se perclorato de potássio. Nos ensaios de número 27 a 34 e utilizou-se perclorato de potássio nas concentrações de 10 mM e 25 mM.

A fase orgânica utilizada para nos ensaios de número 6 a 23 foi composta por uma mistura de ACN : MeOH, na proporção de 70:30, enquanto que nos ensaios de números 27 a 34 utilizou-se apenas ACN. A vazão foi fixada em 0,5 mL.min⁻¹ e a temperatura em 25 °C. Nos ensaios 6 a 14 e 15 a 23 realizou-se ainda leitura utilizando-se os pontos intermediários dos parâmetros variados, ou seja, utilizando 75 mM, pH 4,5 e 40% de fase orgânica.

A Tabela 10 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 10 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Chiralcel OD-RH®

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
1	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (50:50)	0,5
2	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (80:20)	0,5
3	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,05 : ACN (55:45)	0,5
4	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 6,9 : ACN (40:60)	0,5
5	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 6,9 : ACN (80:20)	0,5
6	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7 : EtOH (42:40:18)	0,5
7	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
8	200	20	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
9	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7 : EtOH (42:40:18)	0,5
10	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,1 : EtOH (42:40:18)	0,5
11	200	20	NaH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 2,1 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
12	200	20	NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 2,1 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
13	200	20	ACN : NaH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 2,1 : EtOH (42:40:18)	0,5
14	200	20	NaH ₂ PO ₄ 75 mM, pH 4,52 : ACN : EtOH (60:28:12)	0,5
15	200	20	KClO ₄ 75 mM, pH 4,52 : ACN : EtOH (60:28:12)	0,5
16	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,12 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
17	200	20	ACN : KClO ₄ 100 mM, pH 2,12 : EtOH (42:40:18)	0,5
18	200	20	KClO ₄ 50 mM, pH 2,08 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
19	200	20	ACN : KClO ₄ 50 mM, pH 2,08 : EtOH (42:40:18)	0,5
20	200	20	ACN : KClO ₄ 50 mM, pH 6,96 : ACN : EtOH (42:40:18)	0,5
21	200	20	KClO ₄ 50 mM, pH 6,96 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5

Tabela 10 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Chiralcel OD-RH® (Continuação)

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
22	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 6,90 : ACN : EtOH (80:14:6)	0,5
23	200	20	ACN : KClO ₄ 100 mM, pH 6,90 : EtOH (42:40:18)	0,5
24	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 7: EtOH : ACN (80:14:6)	0,5
25	200	20	MeOH (100)	0,5
26	200	20	EtOH (100)	0,5
27	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 6,94: ACN (80:20)	0,5
28	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 6,94: ACN (40:60)	0,5
29	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 6,93: ACN (40:60)	0,5
30	200	20	KClO ₄ 25 mM 4, pH 6,93: ACN (80:20)	0,5
31	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,05: ACN (80:20)	0,5
32	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,05: ACN (40:60)	0,5
33	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 2,06: ACN (40:60)	0,5
34	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 2,06: ACN (80:20)	0,5
35	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 2,06: ACN (40:60)	0,3
36	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 2,06: MeOH (80:20)	0,5
37	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,05: MeOH (80:20)	0,5
38	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,05: MeOH (80:20)	0,3
39	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,05: EtOH (80:20)	0,4
40	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 2,06: EtOH (80:20)	0,4
41	200	20	KClO ₄ 10 mM, pH 2,06: EtOH (80:20)	0,3
42	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,06: EtOH (80:20)	0,4
43	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,06: EtOH (80:20)	0,3
44	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,06: EtOH (80:20)	0,2
45	200	20	KClO ₄ 25 mM, pH 2,06: EtOH (80:20)	0,1
46	200	20	ACN (100)	0,5
47	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,1)	0,5
48	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,1)	0,3
49	200	20	KClO ₄ 100 mM, pH 2,08 : ACN : DEA (80:20:0,2)	0,5

5.2.4.1.2. Desenvolvimento de método de separação utilizando coluna Burke

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando como fase estacionária quiral uma coluna do tipo (S)- α -Burke-2[®], com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e partícula de 5 μ m. Esta coluna é derivada de dimetil-N-3,5-dinitrobenzoil- α -amino-2,2-dimetil-4-pentenilfosfonato, ligada covalentemente a partículas de sílica gel esféricas, do tipo mercaptopropil. As amostras foram analisadas a 25 °C, com volume de injeção de 20 μ L. A vazão utilizada foi de 1,0 mL.min⁻¹. A detecção do cloridrato de sotalol foi feita a 227 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado.

5.2.4.1.2.1. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 100 mg de cloridrato de sotalol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 25 mL contendo etanol para se obter a concentração de 400 μ g de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições para balões volumétricos com água ultra pura para se obter soluções na concentração de 200 μ g/mL.

5.2.4.1.2.2. Preparação das fases móveis

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do sotalol em fase reversa utilizando coluna quiral Burke[®] foram preparadas diversas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de diferentes solventes. A Tabela 11 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 11 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Burke®

Ensaio	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Vol. injeção (μL)	Fase móvel
1	200	20	MeOH: água com 0,1% de TEA em pH 2,97 (20:80)
2	200	20	MeOH: água com 0,1% de TEA em pH 2,97 (50:50)
3	200	20	MeOH: água com 0,1% de TEA em pH 2,97 (80:20)
4	200	20	MeOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (80:20)
5	200	20	MeOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (50:50)
6	200	20	MeOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (20:80)
7	200	20	EtOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (10:90)
8	200	20	EtOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (90:10)
9	400	20	EtOH 0,02M acetato de amônio : diclorometano (50:50)

5.2.4.1.1. Desenvolvimento de método de separação utilizando coluna

Whelk®

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando como fase estacionária quiral uma coluna do tipo Whelk-O-1®, com 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno, com 5 μm partícula. Esta coluna é derivada de 4-(3,5-dinitro benzamida) tetrahydrofenantreno, ligada covalentemente a partículas de sílica gel esféricas. As amostras foram analisadas a 25 °C, com volume de injeção de 20 μL . A vazão utilizada foi de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A detecção do cloridrato de sotalol foi feita a 227 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado.

5.2.4.1.1.1. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 100 mg de cloridrato de sotalol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 25 mL contendo etanol para se obter a concentração de 400 µg de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições para balões volumétricos com água ultra pura para se obter soluções na concentração de 200 µg/mL.

5.2.4.1.1.2. Preparação das fases móveis

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do sotalol em fase reversa utilizando coluna quiral Whelk® foram preparadas diversas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de diferentes solventes. A Tabela 12 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 12 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Whelk®

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel
1	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (20:80)
2	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (80:20)
3	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (95:5)
4	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (50:50)
5	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (60:40)
6	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (70:30)
7	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,1% TEA pH final 2,75 (75:25)
8	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (80:20)
9	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (50:50)
10	200	20	MeOH: H ₂ O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (20:80)
11	200	20	EtOH: H ₂ O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (20:80)
12	200	20	EtOH: H ₂ O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (50:50)
13	200	20	EtOH: H ₂ O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (80:20)

5.2.4.2. Desenvolvimento de método de separação utilizando fase normal

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando coluna do tipo tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose (Chiralcel OD®), com 250 mm de comprimento x 4,6 mm diâmetro interno, 10 µm partícula como fase estacionária quiral. As amostras foram analisadas a 25 °C, com volume de injeção de 20 µL. A vazão foi variada entre 0,2 e 1,3 mL.min⁻¹. A detecção do cloridrato de sotalol foi feita a 227 nm. O comprimento de onda de 200 nm também foi monitorado.

5.2.4.3. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 100 mg de cloridrato de sotalol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 25 mL contendo etanol para se obter a concentração de 400 µg de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições para balões volumétricos com etanol para se obter soluções na concentração de 200 µg/mL.

5.2.4.4. Preparação das fases móveis

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do sotalol em fase normal utilizando coluna quiral Chiralcel OD ® foram preparadas diversas fases móveis constituídas por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de diferentes solventes. Reagentes com caráter básico foram empregados em pequenas quantidades. A Tabela 13 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela 13 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol utilizando coluna Chiralcel OD®

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Vol. injeção (µL)	Fase móvel	Vazão (mL.min ⁻¹)
1	200	20	Hex : EtOH (99:1)	1,0
2	200	20	Hex : EtOH (90:10)	1,0
3	200	20	Hex : EtOH (80:20)	1,0
4	200	20	Hex : EtOH (70:30)	0,8
5	200	20	Hex : EtOH (50:50)	0,6
6	200	20	EtOH : Hex (80:20)	0,5
7	200	20	EtOH : Hex (90:10)	0,5
8	200	20	EtOH (100)	0,4
9	200	20	EtOH : Hex (90:10)	0,2
10	200	20	EtOH : MeOH : Hex (64:16:20)	0,6
11	200	20	EtOH : MeOH : Hex (72:18:10)	0,5
12	200	20	EtOH : MeOH : Hex (40:40:20)	0,7
13	200	20	EtOH : Hex : MeOH (72:20:8)	0,5
14	200	20	EtOH : Hex : DEA (80:20:0,16)	0,5
15	200	20	EtOH : Hex : DEA (70:30:0,14)	0,5

5.2.5. Desenvolvimento de método de separação para cloridrato de esmolol

utilizando eletroforese capilar

As condições analíticas para a separação dos enantiômeros foram testadas utilizando-se capilar para eletroforese de 40,2 cm x 75 µm de diâmetro interno, com comprimento efetivo (comprimento até o detector) de 30 cm. Foram realizados ensaios utilizando diferentes seletores quirais (β-ciclodextrina hidratada, β-ciclodextrina sulfatada sódica e 2-hidroxipropil-β- ciclodextrina) e sais (fosfato de sódio monobásico e perclorato de potássio) e foram variados parâmetros como tipo e concentração dos eletrólitos, tipo e concentração de ciclodextrina, tensão aplicada (kV), temperatura, volume e tempo de injeção a fim de se alcançar as condições ideais para a separação dos enantiômeros. Os comprimentos de onda monitorados

foram os mesmos utilizados durante os ensaios por CLAE em fase reversa, ou seja, foram monitorados os comprimentos de onda de 230 e 275 nm. Foram realizados ensaios com temperaturas de 15 °C ou 25 °C. As amostras foram injetadas com pressão de 0,3 ou 0,5 psi durante 3 ou 5 segundos. A voltagem aplicada variou conforme a concentração de eletrólito utilizada e conforme a corrente obtida.

5.2.5.1. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 10 mg de cloridrato de esmolol racêmico e transferidos para balão volumétrico de 10 mL contendo água ultra pura para se obter a concentração de 1000 µg de fármaco por mL de solução. As soluções foram homogeneizadas e agitadas em banho ultrassônico por 10 minutos. A partir desta solução foram realizadas diluições com água ultra pura para balões volumétricos para se obter soluções na concentração de 200 µg/mL.

5.2.5.2. Capilares

Foi utilizado capilar de sílica fundida com comprimento de 40,2 cm, com 75 µm de diâmetro interno. Foi feita uma janela de detecção, de aproximadamente 0,5 cm, com a queima do revestimento do capilar. Após a queima, a região foi limpa com algodão embebido em acetona. O comprimento efetivo do capilar (comprimento até o detector) foi de 30 cm. O mesmo capilar foi utilizado tanto para os ensaios de cloridrato de esmolol quanto para os ensaios de cloridrato de sotalol.

5.2.5.2.1. Condicionamento de capilar novo

Antes do uso, o capilar novo foi condicionado através das seguintes etapas de lavagem:

- a) Solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ durante 30 minutos com pressão de 20 psi;
- b) Água ultra pura durante 30 minutos com pressão de 20 psi.

5.2.5.2.2. Preparo do capilar para uso diário

No início de cada dia, o capilar em uso era lavado com solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ durante 15 minutos com pressão de 20 psi, seguido de lavagem com água ultra pura por 15 minutos com pressão de 20 psi. Após estas etapas, era feito condicionamento do capilar com o eletrólito a ser utilizado durante 15 minutos.

5.2.5.2.3. Armazenamento do capilar

No final de cada dia, o capilar em uso era lavado com solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ durante 15 minutos com pressão de 20 psi, seguido de lavagem com água ultra pura por 15 minutos com pressão de 20 psi.

5.2.5.3. Preparação dos eletrólitos

Durante o desenvolvimento analítico para a separação dos enantiômeros do esmolol foram preparados diversos eletrólitos constituídos por misturas de diferentes concentrações e razões variáveis de sais e ciclodextrinas. Todos os eletrólitos de corrida testados foram previamente filtrados e sonicados em banho ultrassônico por

20 minutos. Foram realizados ensaios utilizando-se fosfato de sódio monobásico ou perclorato de potássio, ciclodextrina e solvente orgânico metanol.

A Tabela 14 apresenta as condições eletroforéticas testadas.

Tabela 14 - Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol por eletroforese capilar

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Condições de injeção (pressão (psi); tempo (seg))	Eletrólito	Voltagem (kV)
1	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM + 3,9 mM β-CD hidratada, pH 2,3	20
2	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM + 3,9 mM β-CD hidratada, pH 2,3	15
3	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM + 3,9 mM β-CD hidratada, pH 2,3	10
4	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 7,9 mM β-CD hidratada, pH 2,3	10
5	200	0,5 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 97 mM : 9,8 mM β-CD hidratada, pH 2,16 (9:1)	10
6	200	0,5 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,18	10
7	200	0,5 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,18	12
8	200	0,5 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,18 : MeOH (95:5)	10
9	200	0,5 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 20,0 mM β-CD hidratada, pH 2,05	10
10	200	0,3 psi; 3 seg	KClO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,03	8
11	200	0,3 psi; 3 seg	KClO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,03	10
12	200	0,3 psi; 3 seg	KClO ₄ 75 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,02	8
13	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,57*	15

Tabela 14 – Descrição das condições de análise para cloridrato de esmolol por eletroforese capilar (Continuação)

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Condições de injeção (pressão (psi); tempo (seg))	Eletrólito	Voltagem (kV)
14	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10,0 mM β-CD hidratada, pH 2,57*	18
15	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 20 mM + 10,0 mM 2HP-β-CD, pH 1,95*	15
16	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 20 mM + 10,0 mM 2HP-β-CD, pH 4,28*	15
17	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 10,0 mM 2HP-β-CD, pH 2,48*	12
18	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 10,0 mM β-CD sulfatada, pH 2,25*	8
19	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15,0 mM β-CD sulfatada, pH 2,48*	12
20	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15,0 mM β-CD sulfatada, pH 2,47*	6
21	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15,0 mM β-CD sulfatada, pH 2,47*	8
22	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15,0 mM 2HP-β-CD, pH 2,48 : MeOH (95:5)*	12
23	200**	0,5 psi; 5 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 6,01*	25
24	200**	0,5 psi; 5 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 6,01*	30

seg = segundos; * = ensaio realizado a 15 °C; ** = 1mg amostra: 10 mg 2HP-β-CD; MeOH = metanol

5.2.6. Desenvolvimento de método de separação para cloridrato de sotalol utilizando

eletroforese capilar

Foram realizados ensaios utilizando diferentes seletores quirais (β -ciclodextrina hidratada, β -ciclodextrina sulfatada sódica e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina) e sais (fosfato de sódio monobásico e perclorato de potássio) e foram variados parâmetros como tipo e concentração dos eletrólitos, tipo e concentração de ciclodextrina, tensão aplicada (kV), temperatura, volume e tempo de injeção a fim de se alcançar as condições ideais para a separação dos enantiômeros. Foi monitorado o comprimento de onda monitorado de 227 nm. Foram realizados ensaios com temperaturas de 15 °C ou 25 °C. As amostras foram injetadas com pressão de 0,3 ou 0,5 psi durante 3 ou 5 segundos. A voltagem aplicada variou conforme a concentração de eletrólito utilizada e conforme a corrente obtida.

5.2.6.1. Preparação da amostra

O preparo da amostra de cloridrato de sotalol racêmico foi realizado da mesma forma como as amostras de cloridrato de esmolol (ver item 5.2.5.1).

5.2.6.2. Capilares

O mesmo capilar utilizado para os ensaios de cloridrato de esmolol foi utilizado para os ensaios de cloridrato de sotalol (ver item 0).

5.2.6.3. Preparação dos eletrólitos

O preparo dos eletrólitos de cloridrato de sotalol racêmico foi realizado da mesma forma como para as amostras de cloridrato de esmolol (ver item 5.2.5.3).

A Tabela 15 apresenta as condições eletroforéticas testadas.

Tabela 15 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol por eletroforese capilar

Ensaio	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Condições de injeção (pressão (psi); tempo (seg))	Eletrólito	Voltagem (kV)
1	200	0,3 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3	20
2	200	0,3 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3	15
3	200	0,3 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3	10
4	200	0,3 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 50 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3	10
5	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 50 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3	8
6	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 75 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,15	8
7	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 75 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,15: MeOH (95:5)	8
8	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 75 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,15: MeOH (90:10)	10
9	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 75 mM + 9 mM β -CD hidratada, pH 2,00	8
10	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 50 mM + 10 mM β -CD hidratada, pH 2,18	10
11	200	0,5 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 50 mM + 20 mM β -CD hidratada, pH 2,05	10
12	200	0,3 psi; 3 seg	NaH_2PO_4 50 mM + 20 mM β -CD hidratada, pH 2,05	8

Tabela 15 - Descrição das condições de análise para cloridrato de sotalol por eletroforese capilar (Continuação)

Ensaio	Conc. (µg/mL)	Condições de injeção (pressão (psi); tempo (seg))	Eletrólito	Voltagem (kV)
13	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 75 mM + 20 mM β-CD hidratada, pH 2,05	8
14	200	0,3 psi; 3 seg	KClO ₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,03	8
15	200	0,3 psi; 3 seg	KClO ₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,03	10
16	200	0,3 psi; 3 seg	KClO ₄ 50 mM + 20 mM β-CD hidratada pH 2,03	10
17	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,57*	15
18	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,57*	18
19	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 20 mM + 10 mM 2-HP-β-CD pH 1,95*	15
20	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 20 mM + 10 mM 2-HP-β-CD pH 4,28*	15
21	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 10 mM HP-β-CD pH 2,48*	12
22	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 10 mM β-CD sulfatada pH 2,25	8
23	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15 mM 2-HP- β-CD pH 2,48	12
24	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15 mM 2-HP- β-CD pH 2,48	8
25	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15 mM β-CD sulfatada pH 2,47	6
26	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15 mM β-CD sulfatada pH 2,47	8
27	200	0,3 psi; 3 seg	NaH ₂ PO ₄ 100 mM + 15 mM 2HP-β-CD pH 2,48 : MeOH (95:5)	12
28	200**	0,5 psi; 5 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 6,01*	25
29	200**	0,5 psi; 5 seg	NaH ₂ PO ₄ 25 mM pH 6,01*	30

seg = segundos; * = ensaio realizado a 15 °C; ** = 1mg amostra: 10 mg 2HP-β-CD; MeOH = metanol

5.2.7. Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase reversa

Para a realização da validação em fase reversa, foram padronizados os parâmetros especificados e seguir:

Coluna:	Chiralcel OD-RH (250 mm x 4,6 mm), 5 μ m
Fase Móvel:	Perclorato de potássio 100 mM, pH 2,18 : ACN : DEA (80:20:0,2)
Vazão da Fase	0,6 mL.min ⁻¹
Móvel:	
Volume de injeção:	20 μ L
Deteção:	220 nm (para avaliar a pureza cromatográfica, realizou-se varredura entre 190 e 400 nm)
Temperatura:	30 °C $\pm$ 0,5 °C

5.2.7.1. Seletividade / Especificidade

Com o intuito de avaliar a seletividade / especificidade do método a ser validado, realizaram-se injeções de diluente, fase móvel, placebo, amostra e padrão. Para avaliar a pureza cromatográfica das injeções da seletividade / especificidade, realizou-se varredura entre 190 e 400 nm e o tempo de cada corrida correspondeu ao dobro do tempo de eluição do segundo pico de esmolol. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 μ m, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado.

5.2.7.2. Curva de Calibração

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque. Pesou-se exatamente 20,0 mg de cloridrato de esmolol racêmico e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, utilizando-se água ultra pura como diluente. O balão foi submetido a banho ultrassônico por 10 minutos, a fim de solubilizar o soluto. Resfriou-se a solução até temperatura ambiente e, em seguida, completou-se o volume do balão com água ultra pura.

Alíquotas variando entre 0,7 mL e 1,3 mL da solução padrão estoque foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e os mesmos foram completados com água ultra pura. Considerando-se que foi utilizada mistura racêmica para preparar a curva de calibração, obteve-se um intervalo de concentração variando entre 0,070 e 0,13 mg.mL⁻¹ de cada enantiômero de cloridrato de esmolol.

Cada solução foi injetada em triplicata. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 µm, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado. A curva foi construída utilizando-se a área média das injeções de cada concentração em função da concentração teórica. Os cálculos das retas foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

5.2.7.3. Exatidão

A exatidão foi preparada pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se uma quantidade conhecida do padrão ao medicamento.

Para preparar a solução estoque do padrão, pesou-se exatamente 20,0 mg de padrão de cloridrato de esmolol racêmico e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, utilizando-se água ultra pura como diluente. O balão foi submetido a banho ultrassônico por 10 minutos, a fim de solubilizar o soluto. Resfriou-se a solução até temperatura ambiente e, em seguida, completou-se o volume do balão com água ultra pura.

Para preparar a solução estoque da amostra, pipetou-se 1,0 mL da amostra e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi ajustado e o

mesmo foi homogeneizado. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 0,8 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado e homogeneizado.

Para preparar a exatidão na concentração correspondente a 70% da curva de calibração, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução padrão estoque e 0,5 mL da solução estoque de amostra para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água ultra pura e homogeneizados. Esta solução foi preparada em triplicata.

Para preparar a exatidão na concentração correspondente a 100% da curva de calibração, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução padrão estoque e 0,8 mL da solução estoque de amostra para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água ultra pura e homogeneizados. Esta solução foi preparada em triplicata.

Para preparar a exatidão na concentração correspondente a 130% da curva de calibração, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução padrão estoque e 1,1 mL da solução estoque de amostra para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água ultra pura e homogeneizados. Esta solução foi preparada em triplicata.

Realizou-se ainda injeção contendo apenas o padrão na concentração correspondente às diluições realizadas, ou seja, transferiu-se 0,2 mL da solução padrão estoque para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água ultra pura e homogeneizados. Esta solução foi preparada em triplicata. Também preparou-se a amostra nas concentrações correspondentes às utilizadas no preparo da exatidão nas concentrações de 70%, 100% e 130%, tendo sido transferido, respectivamente, 0,5; 0,8 mL e 1,1 mL da solução estoque de amostra para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água ultra pura e homogeneizados. Cada concentração teve as soluções preparadas em triplicata. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 µm, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado.

A recuperação do método foi calculada através da equação a seguir:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{C_{am+pd} - C_{am}}{C_{pd}} \times 100$$

Equação 12 – Exatidão através do método de adição de padrão

Onde:

C_{am+pd} = concentração da amostra fortificada com padrão

C_{am} = concentração da amostra não fortificada

C_{pd} = concentração do padrão utilizado para fortificar a amostra

5.2.7.4. Precisão

Para preparar precisão da amostra, pipetou-se 1,0 mL da amostra e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi ajustado com água ultra pura e o mesmo foi homogeneizado. Transferiu-se uma alíquota de 0,8 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado e homogeneizado. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água ultra pura e homogeneizados. Foram realizados seis preparos da solução amostra e efetuada uma leitura de cada. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 µm, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado. Os resultados foram avaliados estatisticamente.

A precisão foi realizada em dias diferentes e com analistas diferentes.

5.2.7.5. Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir de diluições sucessivas da solução padrão até se obter um valor de relação sinal/ruído variando entre 10 e 30 e 3 e 10, respectivamente. Utilizou-se como ponto de partida uma solução padrão estoque na concentração correspondente à 0,5%. Todas as

soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 µm, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado.

5.2.8. Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase normal

Para a realização da validação em fase reversa, foram padronizados os parâmetros especificados e seguir:

Coluna:	Chiralcel OD (250 mm x 4,6 mm), 5 µm
Fase Móvel:	Hexano : Etanol : Dietilamina (72:28:0,2)
Vazão da Fase	1,0 mL.min ⁻¹
Móvel:	
Volume de Injeção:	20 µL
Deteção:	220 nm
Temperatura:	30 °C ± 0,5 °C

5.2.8.1. Seletividade / Especificidade

Com o intuito de avaliar a seletividade / especificidade do método a ser validado, realizaram-se injeções de diluente, fase móvel, placebo, amostra e padrão. Para avaliar a pureza cromatográfica das injeções da seletividade / especificidade, realizou-se varredura entre 190 e 400 nm e o tempo de cada corrida correspondeu ao dobro do tempo de eluição do segundo pico de esmolol. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 µm, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado.

5.2.8.2. Curva de Calibração

A solução estoque e diluições realizadas no preparo da curva de calibração foram as mesmas que estão descritas no item 0, tendo sido alterado apenas o diluente para etanol. Cada solução foi injetada em triplicata. A curva foi construída utilizando-se a área média das injeções de cada concentração em função da concentração teórica. Os cálculos das retas foram calculados pelo método dos mínimos quadrados.

5.2.8.3. Exatidão

O preparo das soluções estoque, soluções amostra fortificadas, soluções amostra não fortificadas, soluções padrão na concentração da fortificação foram preparadas do mesmo modo conforme descrito no item 0, tendo sido alterado o diluente para etanol. O cálculo de recuperação do método encontra-se descrito na Equação 12.

5.2.8.4. Precisão

Para preparar precisão da amostra, pipetou-se 1,0 mL da amostra e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. O volume do balão foi ajustado com etanol e o mesmo foi homogeneizado. Transferiu-se uma alíquota de 0,8 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado com etanol e homogeneizado. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL. Os volumes dos balões foram completados com água etanol e homogeneizados. Foram realizados seis preparos da solução amostra e efetuada uma leitura de cada. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 μ m, tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado. Os resultados foram avaliados estatisticamente.

A precisão foi realizada em dias diferentes e com analistas diferentes.

5.2.8.5. Limite de quantificação e limite de detecção

Os limites de quantificação e detecção foram determinados a partir de diluições sucessivas da solução padrão até se obter um valor de relação sinal/ruído variando entre 10 e 30 e 3 e 10, respectivamente. Utilizou-se como ponto de partida uma solução padrão estoque na concentração correspondente à 0,5%. Todas as soluções foram filtradas através de membrana filtrante de 45 μm , tendo sido desprezada a primeira porção do filtrado.

6. RESULTADOS

6.1. Determinação dos espectros de absorção em ultravioleta

Os espectros de ultravioleta do cloridrato de esmolol obtidos pelas análises em pH 2 a 11 e em solventes orgânicos são exibidos na Figura 13 e Figura 14, respectivamente. Os espectros de ultravioleta do cloridrato de sotalol obtidos pelas análises em pH 2 a 11 e em solventes orgânicos são exibidos na Figura 15 e Figura 16, respectivamente.

Figura 13 – Espectro de ultravioleta do cloridrato de esmolol em pH variando entre 2 e 11

A seta com número 1 da Figura 13 indica absorção em 225 nm, e a seta com número 2 indica absorção em 275 nm.

Figura 14 - Espectro de ultravioleta do cloridrato de esmolol em diferentes solventes

Figura 15 - Espectro de ultravioleta do cloridrato de sotalol em pH variando entre 2 e 11

A seta com número 1 da Figura 15 indica absorção em 227 nm, e a seta do número 2 indica absorção em 249 nm.

Figura 16 - Espectro de ultravioleta do cloridrato de sotalol em diferentes solventes

6.2. Determinação do ponto de fusão

As amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Temperaturas de fusão aferidas para cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol

Ensaio	Cloridrato de esmolol	Cloridrato de sotalol
Leitura 1	90 °C	211 °C
Leitura 2	91 °C	212 °C
Leitura 3	90 °C	211°C
Média das leituras	90,3 °C	211,3 °C
Desvio padrão	0,57735	0,57735
Coeficiente de variação	0,006391	0,002732

6.3. Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo por CLAE para cloridrato de esmolol

6.3.1. Desenvolvimento de método de separação utilizando CLAE em fase reversa

A Figura 17 mostra o espectro de cloridrato de esmolol observado no sistema de CLAE durante realização de ensaios em fase reversa.

Figura 17 - Espectro de UV do cloridrato de esmolol obtido em fase reversa por CLAE

A Tabela 17 apresenta as respostas médias dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios descritos na Tabela 8. Os cromatogramas dos planejamentos fatoriais realizados e dos ensaios realizados com DEA são apresentados no APÊNDICE A – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de esmolol por CLAE em fase reversa.

Tabela 17 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
1	-	4,123	7322362	271715	1364	0,05	0,69	0,46	-	-	-	-	-	-	-
2	-	3,605	7123381	120163	537	-0,10	2,81	0,62	-	-	-	-	-	-	-
3	-	3,782	7178229	496637	3496	-0,05	1,75	0,26	-	-	-	-	-	-	-
4	-	3,502	12138623	536785	921	-0,12	0,94	0,46	-	-	-	-	-	-	-
5	-	3,002	10464534	521852	990	-0,25	0,94	0,38	-	-	-	-	-	-	-
6	-	4,752	5555303	99438	167	0,19	3,47	1,47	-	-	-	-	-	-	-
7	-	6,693	11792218	284784	668	0,67	1,18	1,04	-	-	-	-	-	-	-
8	0,00	6,296	1228704	30365	0	0,57	0,00	0,00	6,936	1107937	25313	0	0,73	0,00	0,00
9	-	5,745	5531839	34334	51	0,44	4,33	3,22	-	-	-	-	-	-	-
10	-	5,212	10638832	100141	57	0,30	2,94	2,77	-	-	-	-	-	-	-
11	-	9,528	15698115	204969	239	1,38	2,22	0,55	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	5,201	3686669	56357	139	0,30	2,25	1,76	-	-	-	-	-	-	-
16	-	8,607	6743122	61935	155	1,15	2,55	2,76	-	-	-	-	-	-	-
17	-	7,936	4293145	26764	34	0,99	1,01	2,81	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 17 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®
(Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
18	-	10,878	6134377	35598	58	1,72	1,69	5,70	-	-	-	-	-	-	-
19	-	20,969	15178816	37257	0	4,24	2,18	0,00	-	-	-	-	-	-	-
20	-	10,178	4843774	30661	0	1,54	0,72	0,00	-	-	-	-	-	-	-
21	0,39	7,616	815221	15094	177	0,90	0,00	2,41	8,641	1394532	14027	140	1,16	1,63	2,95
22	0,52	7,807	520552	9626	283	0,95	0,00	1,85	8,981	795662	8500	183	1,25	2,28	2,66
23	0,43	14,776	959043	8572	95	2,69	0,00	6,05	17,227	1405527	77772	173	3,31	2,91	5,23
24	-	8,364	1761532	15022	141	1,09	2,54	2,88	-	-	-	-	-	-	-
25	0,60	8,909	517407	7812	294	1,23	0,00	2,08	10,415	701688	6607	205	1,60	1,25	2,91
26	-	4,843	5357525	186243	438	0,21	0,46	0,98	-	-	-	-	-	-	-
27	0,25	7,936	5563209	197123	457	0,98	0,00	1,49	8,325	7127715	204367	418	1,08	0,52	1,63
28	0,26	4,741	3282411	206261	482	0,19	0,00	0,87	4,963	4394791	220691	563	0,24	0,30	0,84
29	0,30	4,731	3421881	222822	642	0,18	0,00	0,75	4,955	4452862	238079	733	0,24	0,59	0,73
30	0,32	7,900	5791120	229550	837	0,98	0,00	1,09	8,278	7516692	239491	720	1,07	0,00	1,23
31	0,40	4,730	3233043	247310	1312	0,18	0,00	0,52	4,950	4129982	263311	1195	0,24	0,00	0,57
32	-	6,172	15115862	606865	1432	0,54	1,81	0,65	-	-	-	-	-	-	-
33	-	6,244	6118168	269033	1744	0,56	1,55	0,60	-	-	-	-	-	-	-
34	0,47	3,514	6878504	264474	185	-0,12	0,00	0,37	4,259	5607580	163761	339	0,07	0,00	0,93

Tabela 17 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH® (Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
35	0,76	3,604	7730102	312126	409	-0,10	0,00	0,72	4,215	5099001	158509	356	0,05	0,00	0,89
36	0,98	3,477	6077120	233177	350	-0,13	0,00	0,75	4,305	6522425	180369	334	0,08	0,95	0,94
37	1,01	2,867	4641070	227627	343	-0,29	0,00	0,62	3,587	5930913	194275	313	-0,11	1,53	0,82
38	1,12	3,441	5836736	221525	320	-0,14	0,00	0,77	4,401	8101074	222554	347	0,10	0,46	0,94
39	1,15	3,423	4901061	189700	314	-0,14	0,00	0,78	4,350	7985979	249088	422	0,09	1,48	0,85
40	1,18	3,431	15808434	678449	789	-0,15	1,03	0,50	4,149	16069263	520764	534	0,04	1,74	0,73
41	-	8,721	12123788	135351	239	1,18	5,43	2,26	-	-	-	-	-	-	-
42	-	4,326	12341342	524010	1079	0,08	1,15	0,53	-	-	-	-	-	-	-
43	-	4,218	12467860	463059	545	0,06	1,78	0,73	-	-	-	-	-	-	-
44	0,00	12,726	4289023	79951	445	2,18	0,00	2,42	13,650	8011232	62704	0	2,41	0,37	0,00
45	0,00	13,702	4390063	65827	319	2,43	0,00	3,07	14,843	8010647	50296	0	2,71	0,94	0,00
46	-	4,568	12911566	588843	1612	0,14	0,93	0,46	-	-	-	-	-	-	-
47	0,70	3,716	5680795	238711	471	-0,07	0,00	0,69	4,182	7438007	343688	668	0,05	0,00	0,65
48	-	7,732	12980245	323770	886	0,94	1,82	1,04	-	-	-	-	-	-	-
49	-	7,583	12953653	322128	856	0,90	2,05	1,04	-	-	-	-	-	-	-
50	0,72	3,706	5913527	249256	397	-0,07	0,00	0,75	4,184	7411915	366719	805	0,05	0,00	0,59
51	-	4,440	11326920	536699	846	0,11	1,10	0,61	-	-	-	-	-	-	-
52	-	5,363	12770356	527058	1140	0,34	1,38	0,63	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 17 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH® (Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
53	1,48	25,157	6410051	81027	2225	5,29	1,80	2,13	29,064	6045974	49860	1341	6,27	2,09	3,18
54	0,97	3,458	2807435	142998	611	-0,07	0,00	0,61	4,295	10580768	509693	922	0,07	0,96	0,57
55	1,15	19,366	6337855	95521	1788	3,84	2,21	1,83	21,984	6210114	60882	1048	4,50	1,75	2,72
56	0,95	3,739	3326478	161360	566	-0,07	0,00	0,63	4,305	10092420	483486	922	0,08	1,12	0,57
57	0,99	3,730	2823111	142856	650	-0,07	0,00	0,59	4,306	10426987	498045	878	0,08	1,86	0,58
58	0,92	23,570	6142352	51812	760	4,90	0,00	3,43	27,468	6114450	33181	463	5,87	0,40	5,12
59	1,12	28,834	6166687	48262	1065	6,26	2,44	3,54	33,627	5598443	30078	711	7,41	1,70	5,05
60	-	4,368	12705754	524194	638	0,09	1,03	0,70	-	-	-	-	-	-	-
61	-	5,402	12699587	518605	1124	0,35	1,30	0,65	-	-	-	-	-	-	-
62	1,50	16,639	6288489	138362	3019	3,16	1,93	1,21	18,965	6020508	82472	1612	3,74	2,23	1,89
63	1,69	16,153	3881634	106573	4366	3,04	1,70	0,98	18,425	3611335	58799	2107	3,58	2,10	1,60
64	1,60	13,342	3052234	97312	4126	2,34	1,56	0,83	15,117	2966631	54515	1872	2,78	2,15	1,40
65	1,75	15,744	3456491	98450	4584	2,94	1,58	0,93	17,917	3286445	51660	2102	3,48	2,17	1,56
66	1,67	13,163	2815672	92838	4252	2,29	1,47	0,81	14,948	2683598	49452	2008	2,74	2,08	1,33
67	1,72	14,793	3121696	95231	4556	2,70	1,54	0,88	16,795	2942717	50551	2125	3,20	2,10	1,46
68	1,66	12,957	2781829	93636	4263	2,24	1,53	0,79	14,683	2614748	50626	2057	2,67	2,07	1,30
69	1,68	21,516	3488232	72361	4222	4,38	1,68	1,36	24,571	3105483	36992	1929	5,14	2,27	2,32

Tabela 17 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH® (Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
70	1,37	9,863	3478798	166746	5129	1,47	1,66	0,56	10,795	3396480	104072	2788	1,70	1,89	0,82
71	0,44	5,435	2945834	316313	3621	0,36	0,00	0,36	5,628	4380816	306619	1916	0,41	0,00	0,51
72	1,76	15,432	3373341	100530	4745	2,86	1,60	0,89	17,525	3153182	54116	2222	3,38	2,00	1,49
73	1,71	14,214	3244139	110576	5351	2,55	1,45	0,78	15,995	3050429	58431	2408	3,00	2,04	1,30
74	1,71	14,223	3170113	107980	5394	2,56	1,45	0,78	16,010	2980838	56441	2389	3,00	2,08	1,31
75	1,80	14,863	2655520	85316	5144	2,72	1,43	0,83	16,901	2438437	42923	2192	3,23	1,94	1,44

- = valor não determinado devido à ausência de pico

6.3.2. Desenvolvimento de método de separação utilizando CLAE em fase normal

A Figura 18 mostra o espectro do cloridrato de esmolol obtido por CLAE nos ensaios realizados em fase normal.

Figura 18 - Espectro de UV do cloridrato de esmolol obtido em fase normal por CLAE

A Tabela 18 apresenta as respostas médias dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios descritos na Tabela 9. Os cromatogramas dos ensaios realizados com e sem DEA são apresentados no APÊNDICE B – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de esmolol por CLAE em fase normal.

Tabela 18 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase normal utilizando coluna Chiralcel OD®

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,64	36,272	3176201	13507	327	11,09	0,00	8,03	42,040	4097812	11317	290	13,01	2,81	9,88
7	0,30	22,609	2142756	14963	45	6,54	0,00	13,42	25,705	4028391	15683	219	7,57	0,00	6,95
8	0,00	31,459	2184492	10765	0	9,49	0,00	0,00	35,779	4534463	11793	142	10,93	1,89	12,01
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,73	19,700	279133	21828	427	5,57	0,00	3,81	23,007	3779960	18994	309	6,67	2,53	5,23
12	0,49	30,478	2477853	12199	221	9,16	0,00	8,19	34,970	4567659	12812	187	10,66	3,12	10,24
13	0,00	31,381	2052784	9604	0	9,46	0,00	0,00	36,041	4190442	10676	147	11,01	0,00	11,89
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0,00	42,769	1456790	6104	0	13,26	0,00	0,00	47,949	3273201	7051	0	14,98	4,83	0,00
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	0,97	7,738	2105265	90264	2331	1,58	0,00	0,64	8,411	2894240	90196	1997	1,80	0,00	0,75
18	1,09	7,782	2886839	115197	2286	1,60	0,00	0,65	8,561	3625216	109880	1938	1,85	0,00	0,78

Tabela 18 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase normal utilizando coluna Chiralcel OD®
(Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
19	1,39	5,889	3014169	144528	2225	0,96	0,00	0,50	6,670	3461807	128097	1798	1,22	0,00	0,63
20	1,62	5,502	2660688	111410	1481	0,83	2,61	0,57	6,597	2838973	88943	1132	1,20	2,59	0,79
21	2,19	9,188	1892011	38175	1136	2,06	2,87	1,21	12,214	1993071	27927	1209	3,07	2,70	1,75
22	2,67	5,962	864848	33906	1696	0,99	2,45	0,58	7,605	896165	31831	2267	1,54	2,05	0,65
23	2,54	7,734	1122071	37297	1675	1,58	1,93	0,76	9,590	1229670	41452	3047	2,20	2,69	0,72
24	2,17	5,401	1958650	94906	1974	0,80	2,16	0,49	6,659	1993979	72763	1569	1,22	2,15	0,68
25	2,23	4,909	1827745	97148	1980	0,64	2,24	0,44	6,055	1841960	73683	1693	1,02	2,11	0,59
26	1,85	5,726	2809986	131469	2126	0,91	2,30	0,50	6,773	2873417	107478	1857	1,26	2,22	0,63
27	1,85	4,942	1930050	106646	2224	0,65	2,18	0,42	5,814	1945711	88659	1959	0,94	2,06	0,53
28	2,03	4,828	2243496	124815	2105	0,61	2,23	0,42	5,799	2218977	98427	1876	0,93	2,12	0,54
29	2,09	5,004	2264830	122124	2117	0,67	2,16	0,44	6,061	2244217	94364	1778	1,02	2,17	0,58
30	2,36	6,060	1758698	77142	2033	1,02	2,16	0,54	7,605	1725903	59927	1556	1,54	2,55	0,77
31	2,16	5,653	1515706	72213	2054	0,88	2,16	0,50	7,008	1517658	52687	1370	1,34	2,09	0,76
32	2,28	5,838	1405251	66745	2075	0,95	2,00	0,51	7,237	1450274	52143	1636	1,41	2,09	0,72
33	2,28	5,470	1433446	72246	2197	0,82	2,11	0,47	6,706	1434377	57146	1887	1,24	1,93	0,62

Tabela 18 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de esmolol em fase normal utilizando coluna Chiralcel OD® (Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
34	2,12	5,340	1338571	66984	1801	0,78	2,07	0,51	6,495	1333044	55621	2009	1,17	2,02	0,59
35	1,93	4,741	2180170	128363	2181	0,58	2,15	0,41	5,600	2179113	106248	2147	0,87	2,06	0,49
36	1,99	4,648	2145393	129611	2264	0,55	2,15	0,39	5,513	2123098	105346	2112	0,84	2,03	0,48
37	1,92	4,576	2066371	127218	2274	0,53	2,18	0,39	5,400	2090225	104602	2054	0,80	2,04	0,48
38	1,91	4,513	1999197	125301	2456	0,50	2,17	0,37	5,300	2013548	103383	2116	0,77	2,02	0,46
39	2,09	4,901	2129318	122031	2222	0,63	2,13	0,42	5,879	2113675	96510	2046	0,96	2,18	0,52

- = valor não determinado devido à ausência de pico

6.3.3. Desenvolvimento de método utilizando CLAE em escala semi-preparativa

Com base nos ensaios realizados em fase normal em escala analítica, passou-se a realizar ensaios em escala semi-preparativa variando-se entre 70 e 90% de hexano e 10 e 30% de etanol, contendo 0,1% de dietilamina. Foi identificado, porém, que há problemas para evaporar a fase orgânica e retirar a DEA, pois ela é solúvel nos mesmos solventes que a amostra. Optou-se então por realizar ensaios contendo trietilamina, pois, a princípio, seria viável realizar a separação do analito da fase móvel utilizada. Teoricamente, a trietilamina poderia ser precipitada com HCl e separada da amostra posteriormente por filtração, porém a separação obtida não foi satisfatória.

Realizaram-se ensaios em escala semi-preparativa utilizando 60 e 70% de hexano e 30 e 40% de etanol, e 100% de isopropanol sem nenhum tipo de modificador orgânico.

6.4. Desenvolvimento de método de separação enantiosseletiva por CLAE para cloridrato de sotalol

6.4.1. Desenvolvimento de método de separação utilizando Chiralcel OD-RH

A Figura 19 mostra o espectro de cloridrato de sotalol obtido no sistema de CLAE durante realização de ensaios em fase reversa.

Figura 19 - Espectro de UV do cloridrato de sotalol obtido em fase reversa por CLAE

A Tabela 19 apresenta as respostas médias dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios descritos na Tabela 10. Os cromatogramas dos planejamentos fatoriais realizados são apresentados no APÊNDICE C – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE em fase reversa.

Tabela 19 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de sotalol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
1	0,00	3,455	13691732	500467	438	-0,14	0,00	0,66	4,288	4403405	123338	0	0,07	0,00	0,00
2	0,00	3,907	12235332	849412	1972	-0,02	0,00	0,35	4,414	5707623	149196	0	0,10	0,00	0,00
3	0,78	3,519	13264526	506685	467	-0,12	0,00	0,65	4,329	4749293	125052	143	0,08	0,00	1,45
4	1,91	3,551	24281955	865160	1167	-0,11	0,00	0,42	5,039	73150114	1162193	310	0,26	0,00	1,16
5	0,00	3,887	8328721	608981	1878	-0,03	1,14	0,36	4,837	9195912	220351	0	0,21	0,83	0,00
6	-	3,899	14332335	704122	3048	-0,03	0,80	0,29	-	-	-	-	-	-	-
7	2,32	3,932	7806214	712397	3264	-0,02	0,00	0,28	4,921	9930770	376109	1154	0,23	0,99	0,58
8	2,05	3,969	5774867	421323	2171	-0,01	0,00	0,34	4,897	12399463	463282	1191	0,22	1,26	0,57
9	-	3,928	18907684	693962	2902	-0,02	1,71	0,30	-	-	-	-	-	-	-
10	-	3,742	18639067	749372	734	-0,07	1,94	0,56	-	-	-	-	-	-	-
11	1,06	3,901	11750818	1276816	4081	-0,03	0,00	0,25	4,465	6042399	196493	475	0,12	0,00	0,82
12	0,94	3,904	11216431	1289605	4721	-0,02	0,00	0,23	4,437	6212886	191944	377	0,11	0,00	0,91
13	0,00	3,745	15877510	734535	787	-0,06	0,00	0,53	4,201	2853518	137873	0	0,05	0,00	0,00
15	0,00	3,802	10079279	418008	619	-0,05	0,00	0,61	4,454	8638882	243658	0	0,11	0,00	0,00
16	2,01	3,990	3974480	167952	776	0,00	0,00	0,58	5,474	15196350	439401	590	0,37	0,00	0,90
17	0,00	3,737	14844565	657727	706	-0,07	0,00	0,57	4,222	4282337	188028	0	0,06	0,00	0,00
18	2,15	3,996	5749152	348803	1728	0,00	0,00	0,39	5,232	13300655	443088	742	0,31	0,00	0,77

Tabela 19 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de sotalol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®
(Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
14	0,00	3,796	15586791	667683	644	-0,05	0,00	0,60	4,341	3001690	122305	0	0,09	0,00	0,00
19	0,30	3,731	15015637	636749	726	-0,07	0,00	0,56	4,228	4083241	175821	108	0,06	0,00	0,58
20	0,30	3,728	14699432	614854	722	-0,07	0,00	0,56	4,228	4470991	186511	105	0,06	0,00	0,59
21	2,52	3,911	1852306	114481	3075	-0,02	0,00	0,29	5,458	16913362	450919	532	0,36	0,77	0,95
22	2,76	3,903	1604239	184425	5741	-0,02	0,00	0,21	5,636	28990399	689450	461	0,41	0,87	1,05
23	0,00	3,749	20959667	787300	545	-0,06	0,00	0,64	4,277	10279731	402788	0	0,07	0,70	0,00
24	1,78	3,925	1548820	199841	8301	-0,02	0,00	0,17	6,221	30704419	376778	106	0,56	0,71	2,41
25	-	7,683	32709112	379534	251	0,92	0,89	1,95	-	-	-	-	-	-	-
26	-	6,845	32629571	228396	55	0,71	5,84	3,71	-	-	-	-	-	-	-
27	-	5,244	15578731	415956	669	0,31	0,98	0,81	-	-	-	-	-	-	-
28	-	4,390	16402115	400838	286	0,10	1,15	1,04	-	-	-	-	-	-	-
29	-	3,780	11488046	328925	1653	-0,06	0,73	0,44	-	-	-	-	-	-	-
30	2,43	3,907	1756954	139795	2576	-0,02	0,00	0,31	5,114	14612793	436657	896	0,28	0,71	0,69
31	1,40	3,897	6020478	535520	3127	-0,03	0,00	0,28	4,751	10893359	266294	409	0,19	0,63	0,94
32	0,75	3,605	12275464	464620	482	-0,10	0,00	0,66	4,275	4533754	147319	224	0,07	0,80	1,15
33	0,00	3,618	12164222	478291	440	-0,10	0,00	0,69	4,288	5073572	147368	0	0,07	0,00	0,00
34	1,76	3,899	7856174	713852	3306	-0,03	0,63	0,27	4,691	9173495	247488	889	0,17	0,92	0,63
35	-	6,052	28651813	485012	473	0,51	3,12	1,12	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 19 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de sotalol em fase reversa utilizando coluna Chiralcel OD-RH®
(Continuação)

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
36	1,26	4,384	8607340	442960	1619	0,10	1,04	0,44	6,662	5483580	44197	74	0,67	0,70	3,36
37	-	6,993	12759024	80000	420	0,75	0,42	2,2 3	-	-	-	-	-	-	-
38	1,85	8,012	9357837	176611	760	1,00	0,00	1,1 6	14,516	20398770	70927	98	2,63	0,27	5,88
39	0,72	5,918	16318810	332750	337	0,48	0,00	1,3 1	7,107	10172563	181869	190	0,78	0,45	2,06
40	-	5,054	22656313	544955	249	0,26	7,45	1,28	-	-	-	-	-	-	-
41	-	7,054	31709858	489728	227	0,77	3,16	1,88	-	-	-	-	-	-	-
42	-	5,044	23546093	1066188	2636	0,27	9,33	0,40	-	-	-	-	-	-	-
43	-	6,931	32331570	753284	995	0,73	2,81	0,88	-	-	-	-	-	-	-
44	-	10,668	48870005	862377	1349	1,67	2,38	1,16	-	-	-	-	-	-	-
45	-	21,281	92487428	996693	1974	4,32	2,48	1,92	-	-	-	-	-	-	-
46	-	10,412	21483750	102729	27	1,60	0,58	2,00	-	-	-	-	-	-	-
47	-	5,105	10892740	492867	1820	0,28	0,91	0,48	-	-	-	-	-	-	-
48	-	8,498	17725892	541993	1838	1,12	0,92	0,79	-	-	-	-	-	-	-
49	-	5,083	10228286	530704	1857	0,27	0,93	0,47	-	-	-	-	-	-	-

- = valor não determinado devido à ausência de pico

6.4.2. Desenvolvimento de método de separação utilizando CLAE em fase normal

A Figura 20 mostra o espectro de cloridrato de sotalol obtido no sistema de CLAE durante realização de ensaios em fase normal.

Figura 20 - Espectro de UV do cloridrato de sotalol obtido em fase normal por CLAE

A Tabela 20 apresenta as respostas médias dos cromatogramas obtidos com a realização dos ensaios descritos na Tabela 13. Os cromatogramas dos ensaios realizados são apresentados no APÊNDICE D – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE em fase normal.

Tabela 20 – Respostas médias dos cromatogramas obtidos nos ensaios de cloridrato de sotalol em fase normal utilizando coluna Chiralcel OD®

Ensaio	1° pico								2° pico						
	Rs	t ₁	A ₁	h ₁	N ₁	k' ₁	T ₁	w ₁	t ₂	A ₂	h ₂	N ₂	k' ₂	T ₂	w ₂
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	38,214	8941426	22950	228	6,64	4,00	10,34	-	-	-	-	-	-	-
7	-	21,489	8409130	36108	236	3,30	3,41	5,77	-	-	-	-	-	-	-
8	-	31,455	9531319	26820	209	5,29	3,46	9,04	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	22,611	10277195	43997	252	3,52	3,44	5,85	-	-	-	-	-	-	-
11	-	27,714	11075046	35773	216	4,54	3,62	7,74	-	-	-	-	-	-	-
12	-	38,770	10887991	20345	126	6,75	3,79	14,18	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	7,628	8838612	307379	0	0,00	2,64	0,00	-	-	-	-	-	-	-
15	-	7,546	10721844	319790	0	0,00	2,27	0,00	-	-	-	-	-	-	-

- = valor não determinado devido à ausência de pico

6.4.3. Desenvolvimento de método de separação utilizando coluna Burke

Os cromatogramas dos ensaios realizados são apresentados no APÊNDICE E – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE UTILIZANDO COLUNA BURKE.

6.4.4. Desenvolvimento de método de separação utilizando coluna Whelk®

Os cromatogramas dos ensaios realizados são apresentados no APÊNDICE F – Cromatogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por CLAE UTILIZANDO COLUNA WHELK®.

6.5. Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo por eletroforese capilar para cloridrato de esmolol

Os eletroferogramas com os resultados obtidos nos ensaios para o cloridrato de esmolol são apresentados no APÊNDICE G – Eletroferogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de esmolol por eletroforese capilar.

6.6. Desenvolvimento de método de separação enantiosseletivo por eletroforese capilar para cloridrato de sotalol

Os eletroferogramas com os resultados obtidos nos ensaios para o cloridrato de sotalol são apresentados no APÊNDICE H – Eletroferogramas referentes aos ensaios realizados para separação de cloridrato de sotalol por eletroforese capilar.

6.7. Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase reversa

6.7.1. Seletividade / Especificidade

A Figura a seguir apresenta os cromatogramas de diluente, fase móvel, placebo, padrão e amostra. Pode-se observar que o diluente, fase móvel e excipientes não apresentaram picos que coelúissem juntamente com os picos referentes aos enantiômeros do esmolol.

Figura 21 – Cromatogramas referentes à seletividade / especificidade do método em fase reversa

A = diluente; B = fase móvel; C = placebo; D = padrão; E = amostra

6.7.2. Curva de Calibração

As curvas de calibração do primeiro e segundo pico de esmolol e os resultados obtidos após tratamento estatístico dos valores experimentais podem ser visualizados nas figuras a seguir. Os valores do coeficiente de correlação (r) foram de 0,9954 e 0,9951, respectivamente, comprovando a linearidade do método. As equações da reta obtidas foram $y = 15143x + 1112,3$ e $y = 15617x + 1064,9$, para o primeiro e segundo pico, respectivamente.

Figura 22 - Curva de calibração do primeiro de pico de esmolol

Figura 23 - Curva de calibração do segundo de pico de esmolol

6.7.3. Exatidão

Os resultados obtidos para exatidão do primeiro e segundo picos de esmolol são apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 21 – Dados referentes à exatidão do método para cloridrato de esmolol utilizando fase reversa

Concentração		Recuperação Primeiro Pico (%)	Recuperação Segundo Pico (%)
Leitura 1	70%	99,43	100,29
Leitura 2		101,58	101,31
Leitura 3		99,68	101,74
Média		100,23	101,11
CV		1,18	0,74
Leitura 1	100%	101,81	100,31
Leitura 2		101,94	101,56
Leitura 3		101,60	98,81
Média		101,78	100,23
CV		0,17	1,37
Leitura 1	130%	98,66	98,29
Leitura 2		101,56	100,33
Leitura 3		101,95	100,44
Média		100,72	99,69
CV		1,78	1,21

6.7.4. Precisão

Os resultados obtidos para o primeiro e segundo picos de esmolol são apresentados na Tabela a seguir.

Tabela 22 – Dados referentes à precisão do método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase reversa

	Teor (%)	Desvio Padrão	CV (%)	Intervalo de Confiança utilizando t de Student
Primeiro pico	Dia 1: 100,17			
	Dia 2: 97,96	Dia 1: 1,38	Dia 1: 1,38	1,20
	Média: 98,97	Dia 2: 1,56	Dia 2: 1,60	
Segundo pico	Dia 1: 100,81			
	Dia 2: 99,85	Dia 1: 1,19	Dia 1: 1,18	0,95
	Média: 100,33	Dia 2: 1,70	Dia 2: 1,70	

6.7.5. Limite de quantificação e limite de detecção

Os resultados obtidos para o primeiro e segundo pico de esmolol são apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 23 – Limite de quantificação e limite de detecção referentes ao método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase reversa

	Limite de Quantificação		Limite de Detecção	
	Concentração	Relação sinal/ruído	Concentração	Relação sinal/ruído
Primeiro pico	0,1 µg.mL ⁻¹	19,6	0,05 µg.mL ⁻¹	8,0
Segundo pico	0,1 µg.mL ⁻¹	19,2	0,05 µg.mL ⁻¹	7,6

6.8. Validação de método de separação para cloridrato de esmolol em fase normal

6.8.1. Seletividade / Especificidade

A Figura a seguir apresenta os cromatogramas de diluente, fase móvel, placebo, padrão e amostra. Pode-se observar que o diluente, fase móvel e

excipientes não apresentaram picos que coelúissem juntamente com os picos referentes aos enantiômeros do esmolol.

Figura 24 – Cromatogramas referentes à seletividade / especificidade do método em fase normal

A = diluente; B = fase móvel; C = placebo; D = padrão; E = amostra

6.8.2. Curva de Calibração

As curvas de calibração do primeiro e segundo pico de esmolol e os resultados obtidos após tratamento estatístico dos valores experimentais podem ser visualizados nas figuras a seguir. Os valores do coeficiente de correlação (r) foram de 0,9989 e 0,9987, respectivamente, comprovando a linearidade do método. As equações da reta obtidas foram $y = 60543309,88 x - 530707,54$ e $y = 55322627,49x - 736803,31$, para o primeiro e segundo pico, respectivamente.

Figura 25 - Curva de calibração do primeiro de pico de esmolol

Figura 26 - Curva de calibração do segundo de pico de esmolol

6.8.3. Exatidão

Os resultados obtidos para exatidão do primeiro e segundo picos de esmolol são apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 24 – Dados referentes à exatidão do método para cloridrato de esmolol utilizando fase normal

Concentração		Recuperação Primeiro Pico (%)	Recuperação Segundo Pico (%)
Leitura 1	70%	100,34	98,26
Leitura 2		101,73	100,37
Leitura 3		100,41	100,24
Média		100,83	99,62
CV		0,77	1,19
Leitura 1	100%	99,53	99,78
Leitura 2		98,96	100,36
Leitura 3		98,40	99,54
Média		98,97	99,89
CV		0,57	0,42
Leitura 1	130%	99,26	98,84
Leitura 2		101,96	101,94
Leitura 3		100,87	101,14
Média		100,70	100,64
CV		1,35	1,60

6.8.4. Precisão

Os resultados obtidos para o primeiro e segundo picos de esmolol são apresentados na Tabela a seguir.

Tabela 25 – Dados referentes à precisão do método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase normal

	Teor (%)	Desvio Padrão	CV (%)	Intervalo de Confiança utilizando t de Student
Primeiro pico	Dia 1: 100,11			
	Dia 2: 99,93	Dia 1: 1,22	Dia 1: 1,22	0,67
	Média: 100,02	Dia 2: 0,95	Dia 2: 0,95	
Segundo pico	Dia 1: 100,79			
	Dia 2: 99,63	Dia 1: 1,10	Dia 1: 1,09	0,68
	Média: 100,21	Dia 2: 0,72	Dia 2: 0,73	

6.8.5. Limite de quantificação e limite de detecção

Os resultados obtidos para o primeiro e segundo pico de esmolol são apresentados na Tabela abaixo.

Tabela 26 – Limite de quantificação e limite de detecção referentes ao método validado para cloridrato de esmolol utilizando fase normal

	Limite de Quantificação		Limite de Detecção	
	Concentração	Relação sinal/ruído	Concentração	Relação sinal/ruído
Primeiro pico	0,1 µg.mL ⁻¹	18,5	0,05 µg.mL ⁻¹	8,1
Segundo pico	0,1 µg.mL ⁻¹	17,6	0,05 µg.mL ⁻¹	7,3

7. DISCUSSÃO

7.1. Determinação dos espectros de absorção em ultravioleta

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que o esmolol protonado apresentou espectros estáveis entre pH 2 e 11 nos comprimentos de onda entre 190 e 400 nm. Isso ocorre pelo fato da amina estar protonada ou neutra em toda a faixa de pH avaliada, conforme exibido na figura a seguir:

Figura 27 - Grupamentos de cloridrato de esmolol protonados em função do pH do meio (Fonte: Chemicalize)

O sotalol protonado apresentou espectros estáveis entre pH 2 e 9 nos comprimentos de onda entre 190 e 400 nm e em pH 10 e 11 houve deslocamento do pico em 227 nm para 249 nm. Isso ocorre pelo fato do grupamento com átomo de enxofre estar protonado ou neutro em toda a faixa de pH avaliada, conforme exibido na figura a seguir:

Figura 28 - Grupamentos de cloridrato de sotalol protonados em função do pH do meio (Fonte: Chemicalize)

Os perfis dos espectros do cloridrato de esmolol em metanol, etanol e hexano foram semelhantes aos analisados em pH variando entre 2 e 11, havendo diferença nas intensidades de absorvância dos picos. O mesmo ocorreu com os perfis dos espectros de cloridrato de sotalol em metanol, etanol e hexano, sendo os espectros semelhantes aos analisados em pH variando entre 2 e 9.

Pequenas variações de intensidade foram observadas entre as leituras que apresentaram mesmo perfil de espectro, podendo esta variação ter sido causada por diferença de volume entre balões volumétricos, pequenas variações no momento de pipetagem das soluções para realizar as diluições até 10 µg/mL ou por pequenas oscilações entre as leituras.

Com base nos resultados obtidos, foi possível escolher os comprimentos de onda de absorção mais adequados para realização dos ensaios por CLAE. A escolha dos comprimentos de onda influencia na concentração de leitura do fármaco, assim como influencia a estabilidade do sistema e a linha de base.

Os comprimentos de onda a serem selecionados para realizar a validação das metodologias analíticas poderão variar conforme os excipientes presentes na

formulação e solventes utilizados na fase móvel, a fim de evitar a interferência entre estes e os fármacos em análise.

7.2. Determinação do ponto de fusão

A temperatura de fusão esperada para o cloridrato de esmolol era de aproximadamente 85-86 °C e do cloridrato de sotalol era de aproximadamente 206-207 °C (MOFFAT et al., 2004). Os resultados obtidos foram, em média, 4 °C acima dos valores encontrados na literatura. Esta variação pode ter sido causada pelo fato da pureza dos fármacos não ser de 100%. Além deste fato, pode ainda ter ocorrido variação entre os valores teóricos e práticos uma vez que a determinação do início da fusão e a leitura da temperatura no termômetro ser realizada a olho nu.

7.3. Determinação enantiomérica por CLAE

As fases estacionárias quirais utilizadas em análises cromatográficas possuem inúmeras vantagens sobre os métodos indiretos utilizados para a determinação e quantificação de enantiômeros. Por este motivo, optou-se por trabalhar com método de separação direta utilizando FEQs.

A primeira etapa para o desenvolvimento de um método de separação para os enantiômeros de cloridrato de esmolol e cloridrato de sotalol foi escolher a FEQ a ser utilizada. A FEQ selecionada inicialmente foi a 3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose, e o critério de escolha da mesma foi o fato de que é bastante utilizada para separar enantiômeros de diversos β -bloqueadores.

Apesar da FEQ de 3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose ser bastante utilizada em fase normal (coluna Chiralcel OD®) para separar enantiômeros de vários β -bloqueadores, ela pode ser modificada e adaptada para que possa ser utilizada no modo de fase reversa (coluna Chiralcel OD-R® ou Chiralcel OD-RH®). Optou-se por

trabalhar inicialmente com método utilizando fase reversa por ser possível utilizar fase aquosa e, assim, reduzir a quantidade de resíduo gerada por solventes orgânicos.

O mecanismo de reconhecimento quiral da FEQ de 3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose ainda não está completamente elucidado, mas estima-se que ocorra a formação de complexos de inclusão parciais, além de haver formação de pontes de hidrogênio e interações do tipo dipolo-dipolo. A interação dipolo-dipolo com o π -doador, π -aceptor do grupo aril do fármaco e a interação hidrofóbica entre a cavidade e o fármaco irão originar o complexo de inclusão parcial (WAINER, 1993).

7.3.1. Determinação dos enantiômeros de cloridrato de esmolol empregando CLAE

7.3.1.1. Separação enantiomérica utilizando fase reversa

Uma vez escolhida a FEQ a ser utilizada, foram escolhidas as condições de ensaios a serem realizados, levando-se em consideração as restrições e cuidados de utilização da coluna Chiralcel OD-RH®. A vazão da fase móvel utilizada foi limitada pela pressão e vazão máximas toleradas pela coluna.

De acordo com Tachibana (TACHIBANA, 2001), para analitos básicos deve-se levar em consideração o sistema tamponante e pH, pois em situações onde a fase móvel é neutra ou acídica, o analito ficará com carga positiva, fazendo com que o analito não interaja eficientemente com a FEQ e, deste modo, seja eluído rapidamente. Nessas condições, normalmente não há separação quiral. Uma maneira de tornar o analito acessível à FEQ é adicionar quantidades consideráveis de ânions na fase móvel para formar um par iônico que pode ser considerado eletricamente neutro, porém existe limitação da quantidade de sal que pode ser utilizada pelo risco de precipitar na presença de solventes orgânicos. Além disso, o tempo de retenção e resolução são influenciadas pelo tipo de ânion utilizado.

Foram selecionados dois sais para realização dos ensaios: fosfato de sódio monobásico e perclorato de potássio. Os níveis adotados para a molaridade de fosfato de sódio foram fixados em 50, 75 e 100 mM. Concentrações de fosfato de

sódio acima de 150 mM precipitam quando na presença de 20% ou mais de acetonitrila. A molaridade do perclorato de potássio foi fixada em 50, 75 e 100 mM para fins de comparação com o fosfato de sódio. Além disso, o perclorato de potássio possui limitação de solubilidade (máximo de 108 mM).

Foram realizados ensaios utilizando-se os solventes acetonitrila, metanol, etanol e isopropanol. Realizaram-se ensaios contendo DEA e ácido acético com o intuito de melhorar o formato e resolução dos picos.

A Figura 17 mostra o espectro de cloridrato de esmolol observado durante realização de ensaios em fase reversa. O perfil espectral obtido, o qual apresentou picos de maior intensidade em 223 nm e 275 nm, mostrou-se condizente com o espectro obtido por espectrofotometria em ultravioleta.

Observou-se que não houve resolução dos enantiômeros do cloridrato de esmolol quando se utilizou solvente orgânico puro (EtOH, MeOH, IPA). O fosfato de sódio monobásico apresentou resolução parcial dos enantiômeros (R_s em torno de 0,7) quando em pH mais ácido (pH 2) e com menor quantidade de solvente orgânico (20%), porém o grau de separação obtido foi insuficiente. Observou-se ainda que a concentração deste teve pouca influência no grau de separação dos enantiômeros.

A amostra não pode ser testada frente à sua forma não dissociada (8,2; 9,8) devido a limitação de pH da coluna.

Quando utilizou-se perclorato de potássio, foi confirmado o fato de que fases móveis com pH mais ácido (pH 2) e com menor quantidade de solvente orgânico (20%) apresentavam melhor resolução dos enantiômeros. A utilização do perclorato de potássio permitiu uma melhor resolução dos enantiômeros, tendo sido atingido um valor de resolução de 1,48 no ensaio de número 53. Confirmaram-se os relatos feitos por Tachibana (TACHIBANA, 2001), pois ao ser utilizado um sal com maior carga iônica, houve melhora em relação à eficiência de separação. A molaridade de perclorato influenciou no grau de separação.

Como os planejamentos fatoriais foram realizados utilizando-se uma mistura de ACN:EtOH, na proporção 70:30, optou-se por substituir a tal mistura por apenas ACN, com o intuito de aumentar um pouco a polaridade da fase móvel e reduzir o tempo de duração do ensaio. Devido às limitações da coluna, não foi possível realizar ensaios com menor concentração do solvente ACN. Além disso, adicionou-

se DEA e/ou ácido acético como modificadores orgânicos para tentar melhorar o formato dos picos.

Foram realizados ensaios com perclorato de potássio 100 mM, pH 2 : ACN (80:20) e diferentes proporções de DEA e ácido acético. Constatou-se que na presença de 0,1% e 0,2% de DEA houve melhora de simetria dos picos. Quando utilizou-se 0,2% de DEA, pode-se obter melhor simetria e resolução, enquanto que a adição de DEA e 0,2% de CH₃COOH simultaneamente na fase móvel não melhorou a simetria nem a resolução dos picos. O aumento de vazão de 0,5 mL.min⁻¹ para 0,6 mL.min⁻¹ permitiu visualizar que a separação dos enantiômeros teve a resolução e simetria um pouco afetadas.

Com base em todos os dados obtidos, é possível afirmar que o perclorato de potássio 100 mM, em pH 2 a com 20% de ACN e 0,2% DEA apresentou melhores resultados em termos de separação. Além disso, os ensaios realizados nesta condição tiveram $k' > 2$; $R_s > 1,5$; $T \leq 2,0$; $N > 2000$.

7.3.1.2. Separação enantiomérica utilizando fase normal

7.3.1.2.1. Separação enantiomérica utilizando fase normal em escala analítica

Normalmente neste tipo de coluna são utilizados solventes apolares, sendo que o hexano é o solvente mais utilizado. Como modificadores orgânicos utilizam-se etanol e isopropanol. Nesta coluna foi utilizado um aditivo básico (dietilamina) pelo fato do cloridrato de esmolol ser um fármaco com características básicas, o qual tem por finalidade principal reduzir a interação de analitos básicos com os grupos silanóis residuais presentes na sílica empregada como suporte para essa fase estacionária (TANG, 1996).

A Figura 18 mostra o espectro de cloridrato de esmolol observado durante realização de ensaios em fase normal. O perfil espectral obtido, o qual apresentou picos de maior intensidade em 223 nm e 275 nm, mostrou-se condizente com o espectro obtido por espectrofotometria em ultravioleta.

Observou-se que não houve aparecimento de pico do cloridrato de esmolol quando se utilizou hexano nas concentrações entre 99 e 50% na ausência de DEA em ensaios com duração de 60 minutos. Já quando se utilizou etanol como solvente majoritário nas concentrações de 80%, 90% e 100% houve início de separação dos enantiômeros, porém com baixa resolução. O mesmo perfil de separação foi obtido quando foram realizados ensaios utilizando misturas de EtOH:MeOH:Hex, sendo o etanol o solvente majoritário.

Quando foi adicionada DEA, observou-se que quanto maior a concentração de etanol, menor o grau de separação dos enantiômeros. Foi possível observar que a DEA, apesar de ser utilizada em baixas concentrações, exerceu papel fundamental na separação do cloridrato de esmolol em fase normal, pois além de permitir que houvesse resolução entre os enantiômeros, reduziu drasticamente o tempo de corrida.

Com base em todos os dados obtidos, é possível afirmar que na presença de DEA, quanto maior a concentração de hexano, maior a separação entre os picos. Todos os ensaios realizados com DEA em escala analítica que possuíam 70% de hexano ou mais apresentaram $R_s > 1,5$.

7.3.1.2.2. Separação enantiomérica utilizando fase normal em escala semi-preparativa

Ao serem realizados estudos utilizando escala semi-preparativa, observou-se que a amostra, por ser preparada em concentrações maiores quando comparada em relação aos ensaios feitos em escala analítica, precipitava ao ser injetada na coluna devido ao fato da amostra ser pouco solúvel em meio que contém como solvente majoritário o hexano. Ao solubilizar a amostra utilizando a fase móvel na proporção de 70 partes de hexano para 30 partes de etanol, apenas 100 mg eram solubilizados em 10 mL desta mistura, fato que gera a necessidade de realizar um número significativo de injeções para poder se obter uma quantidade considerável dos enantiômeros isolados.

Foram realizadas diversas tentativas utilizando variações na proporção de hexano na fase móvel com o objetivo de melhorar a solubilidade da amostra na fase móvel, porém a separação dos enantiômeros não foi eficaz e o tempo de ensaio aumentou, além de apresentar um rendimento baixo. Estes fatores fizeram com que não fosse interessante dar continuidade com esta abordagem de ensaio, uma vez que os ensaios em escala semi-preparativa possuíam como objetivo ter o maior rendimento possível.

Além disso, ao se tentar recrystalizar a amostra após as separações efetuadas utilizando dietilamina como modificador orgânico, observou-se que a amostra ficava retida junto à DEA, fazendo com que o material obtido após a evaporação do etanol e hexano fosse um semissólido de coloração amarelo escuro. Com base em dados de literatura, optou-se por substituir a DEA por trietilamina (TEA) como modificador orgânico, pois esta poderia ser precipitada com HCl, eliminando assim o problema de recrystalização do esmolol após a coleta das frações separadas por CLAE. Ao serem realizados os ensaios por CLAE utilizando dietilamina como modificador, observou-se que a separação era ineficaz e que o tempo de ensaio aumentava significativamente. Além destes fatores, a amostra continuou apresentando limitação de solubilidade, o que tornou desvantajoso com que testes utilizando este modificador orgânico fossem realizados.

Tentou-se ainda realizar coleta de frações sem utilizar modificadores orgânicos. Foram realizados ensaios utilizando misturas de proporções variáveis entre Hexano : Etanol, Hexano : Isopropanol e apenas Isopropanol. Nestes ensaios levou-se em consideração a quantidade de enantiômero que poderia ser coletada a cada ensaio e não considerou-se se haveria separação total dos enantiômeros, uma vez que o analista a coletar as frações poderia determinar quando realizar a coleta referente a cada pico. Apesar de nenhum dos métodos testados permitir coletar uma quantidade significativa das frações enantioméricas a cada corrida, tentou-se coletar frações utilizando-se mistura de fase móvel Etanol : Hexano nas proporções de, respectivamente, 60 : 40 e 70 : 30, com vazão de 0,7 mL/min. Utilizou-se uma solução contendo 15 mg/mL de cloridrato de esmolol, e injeção de 150 µL, a qual foi realizada manualmente (supondo-se um rendimento de 100%, seria possível coletar 1,125 mg de cada enantiômero a cada corrida). Todas as frações foram coletadas manualmente. Em nenhuma destas situações citadas houve separação total dos

enantiômeros. Cada corrida teve duração de aproximadamente 60 minutos. Tentou-se otimizar o tempo entre cada corrida para aumentar a quantidade de frações coletadas, porém não obteve-se sucesso. Observou-se que é necessário um intervalo de pelo menos 20 minutos entre a coleta da fração do segundo pico de uma injeção e a coleta do primeiro pico da injeção subsequente. Caso contrário, a intensidade dos picos da injeção subsequente era inferior a um quinto da injeção anterior.

As frações obtidas foram evaporadas sob fluxo de nitrogênio. Após as frações serem evaporadas, obteve-se amostra no estado líquido, a qual tentou-se cristalizar utilizando-se etanol aquecido seguida de evaporação sob fluxo de nitrogênio. Após esta etapa, a amostra permaneceu sob forma líquida.

Tentou-se ainda cristalizar esta amostra utilizando-se ácido clorídrico etanólico aquecido. Em seguida, evaporou-se o solvente sob fluxo de nitrogênio. Após esta etapa, a amostra permaneceu sob forma líquida, tendo apresentado a formação de alguns cristais nas paredes dos frascos contendo as frações. Esta formação de cristais, os quais surgiram em pequena quantidade deveu-se ao ácido clorídrico utilizado que foi evaporado.

As colunas clássicas (não imobilizadas) de polissacarídeos por si próprias possuem limitação de solubilidade. A utilização da coluna semi-preparativa Chiralcel OD para separar as frações dos enantiômeros de esmolol não apresentou-se como uma alternativa viável para realizar a coleta de frações para serem utilizados posteriormente como padrão. São necessários mais estudos para que possa ser desenvolvido um método que apresente rendimento satisfatório e que apresente uma relação custo x benefício vantajosa e para encontrar-se um modo de transformar as frações líquidas em um pó, de modo que possam ser pesadas, uma vez que o cloridrato de esmolol apresenta-se na forma sólida.

7.3.2. Determinação dos enantiômeros de cloridrato de sotalol empregando CLAE

7.3.2.1. Separação enantiomérica utilizando fase reversa utilizando Chiralcel

OD-RH®

A Figura 19 mostra o espectro de cloridrato de sotalol observado no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência durante realização de ensaios em fase reversa. O perfil espectral obtido, com pico de maior intensidade em 227 nm, mostrou-se condizente com o espectro obtido por espectrometria em ultravioleta.

As condições de ensaios a serem realizados levaram em consideração as restrições e cuidados de utilização da coluna Chiralcel OD-RH®, do mesmo modo como foi realizado com os ensaios realizados para o cloridrato de esmolol em fase reversa. A vazão da fase móvel utilizada foi limitada pela pressão da coluna, e não poderia exceder de 1,5 mL.min⁻¹.

A amostra não pode ser testada frente à sua forma não dissociada (8,2; 9,8) devido a limitação de pH da coluna.

Os sais selecionados, assim como as molaridades utilizadas para a realização dos ensaios foram os mesmos que os utilizados nos ensaios do cloridrato de esmolol (fosfato de sódio monobásico e perclorato de potássio). Os níveis adotados para a molaridade do fosfato de sódio foram fixados em 50, 75 e 100 mM. A molaridade de perclorato de potássio foi fixada em 50, 75 e 100 mM para um dos planejamentos fatoriais, e para o outro foram utilizadas as molaridades de 10 e 25 mM. Foram realizados ensaios utilizando-se os solventes acetonitrila, metanol e etanol. Realizaram-se ensaios contendo pequenas quantidades de DEA.

Observou-se que os enantiômeros do cloridrato de sotalol foram eluídos muito rapidamente, com eluição no tempo correspondente ao volume morto da coluna quando se utilizou fosfato de sódio monobásico. Os ensaios com este sal que apresentaram resolução parcial foram os ensaios com menor concentração de solvente orgânico (20%) e pH mais alto (pH 7). Esta concentração, porém, pode ser crítica uma vez que um dos valores de pK_a do cloridrato de sotalol é 8,2, o que pode deixar dúvidas quanto ao grau de dissociação da amostra.

Mesmo quando foi utilizado o perclorato de potássio, que possui maior carga iônica que o fosfato de sódio monobásico não se obteve resolução dos enantiômeros e o analito continuou a ser eluido junto com o tempo correspondente ao volume morto da coluna. Os ensaios com este sal que apresentaram início de resolução foram os ensaios com menor concentração de solvente orgânico (20%) e pH mais baixo (pH 2).

Foi levantada a hipótese de que a concentração de sal poderia estar muito elevada e, portanto, realizou-se ensaios utilizando menores molaridades de perclorato de potássio e apenas ACN como solvente orgânico. Os ensaios de número 27 e 30 apresentaram picos um pouco após o volume morto, sendo que o ensaio que apresentou maior concentração de sal (25 mM) não teve separação total entre o pico correspondente ao volume morto e o pico da substância. Estes ensaios que tiveram deslocamento do pico em relação ao volume morto foram realizados em pH 7.

A partir dos ensaios realizados para o cloridrato de sotalol, observou-se que em nenhum dos testes foi observada separação dos enantiômeros. Em todos os casos, a amostra foi eluída rapidamente, indicando que a interação entre o analito e a fase estacionária é muito baixa, sendo praticamente independentemente do pH, proporção de fase móvel, tipo e molaridade dos sais utilizados. A ausência de separação com a coluna Chiralcel OD-RH[®] se deve provavelmente ao fato estrutura do sotalol não possuir um átomo de oxigênio conectado ao grupamento aromático próximo ao centro quiral.

7.3.2.2. Separação enantiomérica utilizando fase normal

A Figura 20 mostra o espectro de cloridrato de sotalol observado no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência durante realização de ensaios em fase normal. O perfil espectral obtido, com pico de maior intensidade em 227 nm, mostrou-se condizente com o espectro obtido por espectrometria em ultravioleta.

As condições de ensaios a serem realizados levaram em consideração as restrições e cuidados de utilização da coluna Chiralcel OD®, do mesmo modo como foi realizado com os ensaios realizados para o cloridrato de esmolol em fase normal.

Observou-se que não houve separação dos enantiômeros do cloridrato de sotalol. A partir dos ensaios realizados, observou-se que em nenhum dos testes foi observada separação dos enantiômeros. Nos ensaios em que houve aparecimento de pico correspondente ao cloridrato de sotalol, os ensaios foram longos e indicam que há interação entre o analito e a fase estacionária, porém não há diferenciação dos enantiômeros que permita separar os mesmos. A ausência de separação com esta coluna se deve provavelmente ao fato estrutura do cloridrato de sotalol não possuir um átomo de oxigênio conectado ao grupamento aromático próximo ao centro quiral.

7.4. Determinação enantiomérica por eletroforese capilar

7.4.1. Determinação dos enantiômeros de cloridrato de esmolol empregando

eletroforese capilar

Diversos ensaios foram realizados utilizando diferentes concentrações de sais e ciclodextrinas. Observou-se que ao realizar ensaios utilizando concentração inferior a 10 mM de ciclodextrina hidratada, independente da concentração de sal utilizada, não foi observada separação total dos enantiômeros de esmolol. Ao utilizar β -ciclodextrina sulfatada como seletor quiral, apenas quando é utilizada voltagem maior (12 kV) foi observada a presença de um pico no eletroferograma, não sendo observada separação enantiomérica. No único caso onde foi observada separação dos enantiômeros, foi quando utilizou-se 2HP- β -CD e baixa concentração de sal. Os ensaios que utilizaram solvente orgânico não apresentaram melhora no formato dos picos.

Diversos fatores influenciaram na separação, tais como o tipo de sal e concentração utilizada, pois o co-íon do sal utilizado possui mobilidade eletroosmótica alta, o que inviabiliza utilizar voltagens mais elevadas devido ao aumento da amperagem. Pretende-se realizar mais ensaios utilizando menores concentrações de NaH_2PO_4 , e/ou utilizar sais que possuam mobilidade eletroosmótica baixa (tal como, ácido acético, TRIS, entre outros) que permitem trabalhar com voltagens maiores e valores de corrente menores.

O ensaio que apresentou separação dos enantiômeros de esmolol (ensaio 24) utilizou pH mais próximo à neutralidade, concentração baixa de eletrólito e maior voltagem (30 kV), porém este ensaio não se mostrou reprodutível.

7.4.2. Determinação dos enantiômeros de cloridrato de sotalol empregando eletroforese capilar

Diversos ensaios foram realizados utilizando diferentes concentrações de sais e ciclodextrinas. Observou-se que ao realizar ensaios utilizando concentração inferior a 10 mM de ciclodextrina hidratada e concentração de até 75 mM de NaH_2PO_4 , houve separação parcial dos enantiômeros de sotalol. Nestes ensaios (1 a 7), foram observados 3 picos no eletroferograma, não se sabendo justificar a presença dos mesmos, pois eram esperados apenas dois picos. Ao realizar os ensaios (8 a 18), cuja algumas condições foram semelhantes às dos ensaios 1 a 7, não se observou mais separação dos enantiômeros de sotalol.

Os ensaios que utilizaram solvente orgânico não apresentaram melhora no formato dos picos. Ao utilizar β -ciclodextrina sulfatada como seletor quiral, em nenhum caso foi observada a presença de pico no eletroferograma. Já ao utilizar 2HP- β -ciclodextrina, foi observada a presença de picos no eletroferograma, porém com nenhum indicativo de separação enantiomérica.

7.4.3. Validação dos métodos de separação para cloridrato de esmolol em fase reversa e fase normal

A validação de um métodos analítico é realizada para comprovar que o método é adequado para o fim ao qual se propõe, com o intuito de reduzir e/ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão dos dados gerados.

Com base nos resultados obtidos tanto na validação realizada em fase reversa quanto na validação realizada em fase normal, pode-se concluir que dois métodos validados foram considerados precisos, seletivos, específicos, exatos e lineares para a quantificação dos enantiômeros de esmolol em medicamento.

8. CONCLUSÕES

Os testes de UV permitiram caracterizar a amostra e forneceram dados importantes para o início do desenvolvimento de metodologia por CLAE, pois com base nestes foi possível determinar quais os comprimentos de onda com maior intensidade para serem monitorados por CLAE e eletroforese capilar.

Os dados obtidos pelo ponto de fusão foram utilizados na etapa de purificação da amostra, com o intuito de estabelecer qual a temperatura máxima que poderia ser utilizada na etapa de evaporação dos solventes e cristalização das amostras após a obtenção das frações em escala semi-preparativa.

Os testes com cloridrato de sotalol por CLAE não indicaram separação dos enantiômeros do mesmo ao serem utilizadas coluna Chiralcel OD®, Chiralcel OD-RH®, Burke e Whelk®.

Os resultados obtidos para o cloridrato de esmolol utilizando CLAE em fase reversa foram satisfatórios. A partir dos resultados obtidos na validação, pode-se concluir que o método é preciso, seletivo, específico, exato e linear para a quantificação dos enantiômeros de esmolol em medicamento. Os resultados obtidos para este princípio ativo utilizando CLAE em fase normal foram satisfatórios e, assim como o método em fase reversa, o método demonstrou ser preciso, seletivo, específico, exato e linear para a quantificação dos enantiômeros de esmolol em medicamento. O método validado em fase reversa apresenta como vantagem o fato de utilizar menor quantidade de solvente orgânico. Por outro lado, o método validado em fase normal apresenta como vantagem o tempo reduzido de análise, quando comparado com o método validado em fase reversa. Não foi possível determinar a ordem de eluição devido à ausência dos enantiômeros puros.

O processo de obtenção dos enantiômeros puros do princípio ativo Cloridrato de Esmolol proposto inicialmente não demonstrou viabilidade através dos ensaios realizados. Inicialmente, desenvolveu-se o método em escala analítica em fase normal, visando um tempo de eluição rápido, com resolução entre os picos para posteriormente extrapolar o método para escala semi-preparativa, onde seriam injetados altos volumes/massas da mistura racêmica e coletadas as frações dos enantiômeros. A dietilamina presente na fase móvel foi determinante para a

separação das frações de esmolol, porém, a obtenção das frações puras após a separação por CLAE-FEQ em escala analítica foi inviabilizada devido à similaridade de solubilidade entre a dietilamina e o cloridrato de esmolol. Foram tentadas alternativas utilizando trietilamina ao invés de dietilamina e outras proporções e misturas de fases móveis, porém nenhuma apresentou resolução tão boa quanto à do método que utilizava dietilamina. Todos os métodos testados para obtenção das frações apresentaram rendimento baixo. Além disso, colunas clássicas (não imobilizadas) de polissacarídeos por si próprias possuem limitação de solubilidade, o que neste caso, não apresentou-se como uma alternativa viável para realizar a coleta de frações.

Novos estudos para a obtenção dos enantiômeros puros do cloridrato de esmolol são necessários. Como alternativa, poderiam ser testadas misturas de diferentes solventes em proporções variadas sem nenhum tipo de modificador orgânico, poderia se tentar separar as frações utilizando dietilamina e investir em algum método para separar a dietilamina do cloridrato de esmolol. Para ambos os casos, deve-se levar em consideração a limitação de solubilidade que a própria coluna Chiralcel OD® apresenta. Como outra possibilidade, poderia ser utilizada coluna com outro tipo de imobilização e desenvolver novamente um método que apresente resolução entre os enantiômeros de esmolol para posteriormente coletar e purificar tais frações.

Apesar de ter sido observada separação enantiomérica nos ensaios realizados por eletroforese capilar, os resultados não foram satisfatórios, pois apresentaram problemas de reprodutibilidade do método. Estima-se que tal variação possa ter sido causada pela diferença de encaixe dos enantiômeros nas ciclodextrinas utilizadas como seletor quiral ou ainda por não ter sido atingido um método de separação eficaz.

Mais estudos para a obtenção dos enantiômeros puros por eletroforese capilar são necessários. A partir dos dados já existentes nesta dissertação, poderiam ser otimizadas a quantidade e tipo de ciclodextrina utilizada e avaliar se é mais interessante utilizá-la juntamente com o diluente da solução amostra ou com o eletrólito de corrida. Além disso, pode-se alterar a pressão e tempo de injeção da amostra e concentração dos eletrólitos utilizados e utilizar solventes orgânicos em pequenas quantidades para melhorar a separação dos enantiômeros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Chiral separations by liquid chromatography and related technologies. New York, Marcel Dekker, 2003. 366 p.

AHUJA, S., ed. **Chiral separations by liquid chromatography**. Washington: American Chemical Society, 1991. 239p.

AHUJA, S., ed. **Chiral separations: applications and technology**. Washington: American Chemical Society, 1997. 349p.

ALEBIC-KOLBAH, T.; ZAVITSANOS, A.P. Chiral bioanalysis by normal phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v.759, p.65-77, 1997.

ALTRIA, K.D. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications**. Totowa: Humana Press, 1996a. 349p. (Methods in molecular biology, v.52).

ALTRIA, K.D. Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.735, p.43-56, 1996b.

ALTRIA, K.D.; KELLY, M.A.; CLARK, B.J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis II. Trac, **Trends in Analytical Chemistry**, v.17, n.4, p.214-226, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. 18 ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005.

ATES, H.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y.V. Chiral separations in polar organic solvent chromatography: updating a screening strategy with new chlorine-containing polysaccharide-based selectors. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.875, n.1, p.57-64, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AWADALLAH, B.; SCHMIDT, P.C.; HOLZGRABE, U.; WAHL, M.A. Quantitation of talinolol and other β -blockers by capillary electrophoresis for *in vitro* drug absorption studies. **Electrophoresis**, v.24, n.15, p.2627–2632, 2003.

BADALONI, E.; D'ACQUARICA, I.; GASPARRINI, F.; LALLI, S.; MISITI, D.; PAZZUCCONI, F.; SIRTORI, C.R. Enantioselective liquid chromatographic electrospray mass spectrometric assay of β -adrenergic blockers: application to a pharmacokinetic study of sotalol in human plasma. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.796, n.1, p.45–54, 2003.

BAKER, D.R. **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley, 1995. 244p. (Techniques in analytical chemistry series).

BARBATO, F.; CARPENTIERO, C.; GRUMETTO, L.; LA ROTONDA, M.I. Enantioselective retention of β -blocking agents on human serum albumin and α_1 -acid glycoprotein HPLC columns: relationships with different scales of lipophilicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, n.5, p.472–478, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 2003. 401p. (Coleção livro-texto).

BASAK, A.K.; RAW, A.S.; AL HAKIM, A.H.; FURNESS, S.; SAMAN, N.I.; GILL, D.S.; PATEL, H.B.; POWERS, R.F.; YU, L. Pharmaceutical impurities: regulatory perspective for abbreviated new drug applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.64–72, 2007.

BECHET, I.; PAQUES, P.; FILLET, M.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Chiral separation of basic drugs by capillary zone electrophoresis with cyclodextrin additives. **Electrophoresis**, v. 15, p.818-823, 1994.

BENOITZ, N.L. Antihypertensive agents. In: KATZUNG, B.G., ed. **Basic & clinical pharmacology**. 10.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2007. cap.11, p.159-182. (Lange medical book).

BERTHOD, A. Chiral recognition mechanism. **Analytical chemistry**, v.78, p. 2093-2099, 2006.

BINGCHENG, L.; XIAOFENG, Z. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part 6. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral solvating agent. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.21, n.4, p.215-224, 1998.

BLANCO, M.; VALVERDE, I. Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis. *Trac*, **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.7/8, p.428-439, 2003.

BOJARSKI, J. ABOUL-ENEIN, H.Y. Recent applications of chromatographic resolution of enantiomers in pharmaceutical analysis. **Biomedical Chromatography**, v.880, p.563-576, 2002.

BONATO, P.S.; PAIAS, F.O. Enantioselective analysis of omeprazole in pharmaceutical formulations by chiral high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.2, p.318-323, 2004.

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P.; GAITANI, C.M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683-691, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.135, de 29 de maio de 2003a**. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/135_03rdc.htm. Acesso em: 20 ago. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.136, de 29 de maio de 2003b**. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos+-+Comercializacao+-+Pos+-+Uso/Farmacovigilancia/Assunto+de+Interesse/LegislacaoLegislation/20030529+136>. Acesso em: 20 ago. 2012.

BRASIL. Resolução RDC n.57, de 18 de novembro de 2009. Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 220, 18 nov., 2009. Seção 1, p. 39-40.

BRASIL. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.104, 02 jun., 2003. Seção 1, p. 56-59.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Her Majesty's Stationary Office, 2009a. v. II. p. 1903-1906, v. IV. p. A 586

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I., eds. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11 ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p.179, 183, 590, 602.

BURKE, D. HENDERSON, D.J.; Chirality: a blueprint for the future. **British Journal of Anaesthesia**. v.88, n.4, p.563-576, 2002.

CALDWELL, J.; WAINER, I.W. Stereochemistry: definitions and a note on nomenclature. **Human Psychopharmacology**, v.16, Suppl.2, p.S105-S107, 2001.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. Ed. UFSCar. Universidade Federal de São Carlos, Série apontamentos, São Paulo, 2001.

CECCATO, A.; CROMMEN, H.J. Direct liquid chromatographic enantioseparation of sotalol and other β -blockers using an α -acid glycoprotein-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography, A**, v.760, p.193-203, 1997.

CHASSAING, C.; THIENPONT, A.; FÉLIX, G. Regioselective carbamoylated and benzoylated cellulose for the separation of enantiomers in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.738, p.157-167, 1996.

COFFEN, D.L. Enzyme-catalyzed reactions. In: AHUJA, S., ed. **Chiral separations: applications and technology**. Washington: American Chemical Society, 1997. p.59-91, 143.

CONSTANTIN, S.; BICKER, W.; ZARBL, E.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Enantioselective strong cation-exchange molecular recognition materials: design of novel chiral stationary phases and their application for enantioseparation of chiral bases by nonaqueous capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v.24, n.10, p.1668-1679, 2003.

DAVANKOV, V.A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? **Chirality**, v.9, p.99-102, 1997.

DEF 2011/2012: Dicionário de especialidades farmacêuticas. 40.ed. Rio de Janeiro. Publicações Científicas, 2011. 922p.

DIAS, A.G.; SOARES, R.O. Quiralidade em moléculas e cristais. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2230-2233, 2009.

DOSSOU, K.S.S.; CHIAP, P.; CHANKVETADZE, B.; SERVAIS, A.C.; FILLET, M.; CROMMEN, J. Enantioresolution of basic pharmaceuticals using cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) as chiral stationary phase and polar organic mobile phases. **Journal of Chromatography, A**, v.1216, n.44, p.7450–7455, 2009.

DOSSOU, K.S.S.; CHIAP, P.; CHANKVETADZE, B.; SERVAIS, A.C.; FILLET, M.; CROMMEN, J. Optimization of the LC enantioseparation of chiral pharmaceuticals using cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate) as chiral selector and polar non-aqueous mobile phases. **Journal of Separation Science**, v.33, n.12, p.1699–1707, 2010.

DOSSOU, K.S.S.; CHIAP, P.; SERVAIS, A.C.; FILLET, M.; CROMMEN, J. Evaluation of chlorine containing cellulose-based chiral stationary phases for the LC enantioseparation of basic pharmaceuticals using polar non-aqueous mobile phases. **Journal of Separation Science**, v.34, n.6, p.617–622, 2011.

DRUG BANK. Esmolol. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00187>. Acesso em: 14 abr., 2012.

EKELUND, J. VAN ARKENS, A.; BRØNNUM-HANSEN, K.; FICH, K.; OLSEN, L.; PETERSEN, P.V. Chiral separations of β -blocking drug substances using chiral stationary phases. **Journal of Chromatography, A**, v.708, n.2, p.253-261, 1995.

ERHARDT, P. Drug discovery. In: HACKER, M.P.; MESSER, W.S.; BACHMANN, K.A. **Pharmacology**: principles and practice. Amsterdam: Elsevier, 2009. cap.19, p.538-539, 542-546.

ERIKSSON, T. BJÖRKMAN, S.; ROTH, B.; FYGE, A.; HÖGLUND, P. Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. **Chirality**, v.7, p.44-52, 1995.

ERIKSSON, T. BJÖRKMAN, S. HÖGLUND, P. Clinical pharmacology of thalidomide. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 57, p. 365-376, 2001.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: Eurachem, 1998. 54p.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **ICH Topic Q2A Validation of Analytical Procedures: Text and methodology**: Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. (CPMP/ICH/381/95). London: EMEA, 1995. Disponível em: <http://www.pharma.gally.ch/ich/q2a038195en.pdf>. Acesso em: 14 abr., 2012.

EUROPEAN Pharmacopoeia 6.0. Strasbourg: Council of Europe, 2008. p.2944-2945.

FANG, Z.; GUO, Q.; QIN, Q.; FAN, J.; YIN, Y.; ZHANG, W. Semi-preparative enantiomeric separation of ofloxacin by HPLC. **Journal of Chromatographic Science**, v.51, p.133-137, 2013.

FANG, L.; BYKOWSKI-JURKIEWICZ, C.; SARVER, J.G.; ERHARDT, P.W. Determination of esmolol and metabolite enantiomers within human plasma using chiral column chromatography. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.878, n.26, p.2449-2452, 2010.

FERRAZ, V. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. 32 p.

FIRMIDA, C.C.; MESQUITA, E.T. O paradoxo do tratamento da ICC com betabloqueadores. Implicação para pacientes hipertensos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.8, n.4, p.458-465, 2001.

FORET, F.; KRIVANKOVA, L.; BOCEK, P. **Capillary zone electrophoresis**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1993. 346p. (Electrophoresis library).

FASSIHI, A.R. Racemates and enantiomers in drug development. **International Journal of Pharmaceutics**, v.92, p.1-14, 1993.

FILLET, M.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Method development strategies for the enantioseparations of drugs by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral additives. **Electrophoresis**, v.19, p.2834-2840, 1998.

FRANCOTTE, E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. **Journal of Chromatography, A**, v.906, p.379–397, 2001.

FULDE, K.; FRAHM, A.W. Temperature-induced inversion of elution order in the enantioseparation of sotalol on a cellobiohydrolase I-based stationary phase. **Journal of Chromatography, A**, v.858, p.33-43, 1999.

GAGYI, L.; GYÉRESI, Á.; KILÁR, F. Role of chemical structure in stereoselective recognition of β -blockers by cyclodextrins in capillary zone electrophoresis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.70, p.1268–1275, 2008.

GASPARRINI, F.; MISITI, D.; VILLANI, C. Chromatographic resolution of 1,2-amino alcohols on a chiral stationary phase containing N,N'-(3,5 dinitrobenzoyl)-trans,2-diaminocyclohexane. **Journal of Chromatography**, v.539, p.25-36, 1991.

GROBUSCHEK, N. SCHMID, M.G.; KOIDL, J.; GÜBITZ, G. Enantioseparation of amino acids and drugs by CEC, pressure supported CEC, and micro-HPLC using a teicoplanin aglycone stationary phase. **Journal of Separation Science**, v.25, n.15/17, p.1297–1302, 2002.

GRUETTER, C.A. **The comprehensive pharmacology reference**. New York: Elsevier, 2007.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques: a review. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.22, p.291–336, 2001.

HEBENSTREIT, D.; BICKER, W.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Novel enantioselective strong cation exchangers based on sulfodipeptide selectors: evaluation for enantiomer separation of chiral bases by nonaqueous capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v.25, n.2, p.277-289, 2004.

HEDELAND, Y.; LEHTINEN, J.; PETTERSSON, C. Ketopinic acid and diisopropylideneketogulonic acid as chiral ion-pair selectors in capillary electrophoresis enantiomeric impurity analysis of S-timolol and 1R,2S-ephedrine. **Journal of Chromatography, A**, v.1141, p.287-294, 2007.

HEUERMANN, M.; BLASCHKE, G. Chiral separation of basic drugs using cyclodextrins as chiral pseudo-stationary phases in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v.648, p.261-274, 1993.

HIDESHIMA, T.; CHAUHAN, D.; SHIMA, Y.; RAJE, N.; DAVIES, F.E.; TAI, Y.T.; TREON, S.P.; LIN, B.; SCHLOSSMAN, R.L.; RICHARDSON, P.; MULLER, G.; STIRLING, D.I.; ANDERSON, K.C. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. **Blood**, v.96, n.9, p.2943-2950, 2000.

HOFFMAN, B.B. Adrenoceptor antagonist drugs. In: KATZUNG, B.G., ed. **Basic & clinical pharmacology**. 10.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2007. cap.10, p.306-335. (Lange medical book).

HU, S.; CHEN, Y.; ZHU, H.; ZHU, J.; YAN, N.; CHEN, X. *In situ* synthesis of di-n-butyl l-tartrate–boric acid complex chiral selector and its application in chiral microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1216, n.45, p.7932–7940, 2009.

HUANG, L.; LIN, J.M.; YU, L.; XU, L.; CHEN, G. Field-amplified on-line sample stacking for simultaneous enantioseparation and determination of some beta-blockers using capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.29, n.17, p.3588–3594, 2008.

HUME, J.R.; GRANT, A.O. Agents used in cardiac arrhythmias. In: KATZUNG, B.G., ed. **Basic & clinical pharmacology**. 10.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2007. cap.14, p.211-235. (Lange medical book).

HUTT, A.J.; VALENTOVÁ, J. The chiral switch: The development of single enantiomer drugs from racemates. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**. Bratislava, v.50, p.7-23, 2003.

HUYNH, N.H.; KARLSSON, A.; PETTERSSON, C. Enantiomeric separation of basic drugs using N-benzyloxycarbonylglycyl-L-proline as counter ion in methanol. **Journal of Chromatography, A**, v.705, p.275-287, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**: DOQ-CGCRE-008. Revisão 3. 2010. Disponível em: http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf. Acesso em: 10 abr., 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Q2(R1) Validation of analytical procedures: text and methodology.** 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 09 mar, 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Quality Guidelines. Analytical Validation Q3A - Q3D. **Q3A(R2) Impurities in New Drug Substances.** 2006a. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 09 mar, 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Quality Guidelines. Analytical Validation Q3A - Q3D. **Q3B(R2) Impurities in New Drug Products.** 2006b. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 09 mar, 2012.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO/IEC 17025:2005:** general requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Disponível em: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=39883. Acesso em: 09 mar, 2012.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Analytical Chemistry Division. Commission on chromatography and other analytical separations. Commission on analytical nomenclature. Nomenclature for chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, v.65, n.4, p.819-872, 1993.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Analytical Chemistry Division. Electrochemical detection in liquid flow analytical techniques: characterization and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v.76, n.6, p.1119-1138, 2004a.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Analytical Chemistry Division. Terminology for analytical capillary electromigration techniques. **Pure and Applied Chemistry**, v.76, n.2, p.443-451, 2004b.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC Technical report: harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

JIANG, Z.; THOROGATE, R.; SMITH, N.W. Highlighting the role of the hydroxyl position on the alkyl spacer of hydroxypropyl- β -cyclodextrin for enantioseparation in capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v.31, p.177–187, 2008.

JUVANCZ, Z.; KENDROVICS, R.B.; IVÁNYI, R.; SZENTE, L. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.29, p.1701–1712, 2008.

KAMANDE, M.W.; ZHU, X.; CHRISTODOULOU, C.K.; WARNER, I.M. Chiral separations using a polypeptide and polymeric dipeptide surfactant polyelectrolyte multilayer coating in open-tubular capillary electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v.76, n.22, p.6681-6692, 2004.

KARLSSON, C.; WIKSTRÖM, H.; AMSTRONG, D.M.; OWENS, P.K. Enantioselective reversed-phase and non-aqueous capillary electrochromatography using a teicoplanin chiral stationary phase. **Journal of Chromatography, A**, v.897, n.1/2, p.349–363, 2000.

KASAI, H.F.; TSUBUKI, M.; MATSUO, S.; HONDA, T. Sub- and supercritical chiral separation of racemic compounds on columns with stationary phases having different functional groups. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.10, p.1270-1276, 2005.

KOPPENHOEFER, B.; EPPERLEIN, U.; XIAOFENG, Z.; BINGCHENG, L. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis. Part 4. Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin as chiral solvating agent. **Electrophoresis**, v.18, n.6, p.924–930, 1997.

KOPPENHOEFER, B.; EPPERLEIN, U.; SCHLUNK, R.; ZHU, X.; LIN, B. Separation of enantiomers of drugs by capillary electrophoresis V. Hydroxypropyl-alpha-cyclodextrin as chiral solvating agent. **Journal of Chromatography, A**, v.793, n.1, p.153–164, 1998.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. **Capillary electrophoresis: principles and practice**. Berlin: Springer, 1993. 375p. (Springer Laboratory).

LANÇAS, F M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: RiMa, 2004. 46p.

LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem química. **Química Nova**, v.20, n.6, p.657-663, 1997.

LINDNER, W. Recent development in HPLC enantioseparations: a selected review. **Chromatographia**, v.24, p.97-107, 1987.

LIPKOWITZ, K.B. Theoretical studies of type II-V chiral stationary phases: review. **Journal of Chromatography, A**, v.694, p.15-37, 1995.

LIU, J.Y.; DONG, Y.Y.; WANG, T.S.; LIU, H.W.; HUANG, A.J.; SUN, Y.L.; SUN, Z.P. Separation of chiral drugs with sulfobutylether- β -cyclodextrin by capillary zone electrophoresis. **Chinese Chemical Letters**, v.10, n.1, p.39-42, 1999.

LOCHMÜLLER, C.H.; SOUTER, R.W. Chromatographic resolution of enantiomers: selective review. **Journal of Chromatography**, v.113, p.283-302, 1975.

LODÉN, H.; HEDELAND, Y.; HEDELAND, M.; BONDESSON, U.; PETTERSSON, C. Development of a chiral non-aqueous capillary electrophoretic system using the partial filling technique with UV and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography, A**, v.986, n.1, p.143-152, 2003.

LU, H.; CHEN, G. Recent advances of enantioseparations in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Analytical Methods**, v.3, p.488-508, 2011.

MAIER, N.M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography, A**, v.906, p.3-33, 2001.

MANCHESTER, K.L. Louis Pasteur (1822-1895) – chance and the prepared mind. **Tibtech**, v.13, p.511-515, 1995.

MANGELINGS, D.; HARDIES, N.; MAFTOUH, M.; Suteu, C.; MASSART, D.L.; VANCER HEYDEN, Y. Enantioseparations of basic and bifunctional pharmaceuticals by capillary electrochromatography using polysaccharide stationary phases. **Electrophoresis**, v.24, n.15, p.2567-2576, 2003.

MARTINDALE: the complete drug reference. 36.ed. Pharmaceutical Press, 2009. p.1282-1283, 1398-1399.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.A.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J. Potential of human serum albumin as chiral selector of basic drugs in affinity electrokinetic chromatography-partial filling technique. **Electrophoresis**, v.27, n.21, p.4364–4374, 2006

MASON, S.F. Universal dissymmetry and the origin of biomolecular chirality. **BioSystems**, v.20, p.27-35, 1987.

MASON, S. Biomolecular homochirality. **Chemical Society Reviews**, v.17, p.347-359, 1988.

McCONALTHY, J.; OWENS, M.J. Stereochemistry in drug action. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, v.5, n.2, p.70-73, 2003.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 13.ed. Whitehouse Station: Merck, 2001.

MIRANDA, J.C.; MARTINS, T.E.A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.47, n.4, p.665-681, 2011.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B., eds. **Clarke's analysis of drugs and poisons**. 3.ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 1931 pág.

MORANTE-ZARCERO, S.; SIERRA, I. Comparative HPLC methods for β -blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes. Analysis of propranolol enantiomers in natural waters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.62, p.33– 41, 2012.

MUCHA, D.; STADNICKA, K.; KAMINSKY, W.; GLAZER, A.M. Determination of optical activity in monoclinic crystals of tartaric acid, (2R, 3R)-(+)-C₄H₆O₆, using the 'tilter' method. **J. Phys.: Condens Matter**, v.9, p.10829-10842, 1997.

NGUYEN, L.A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an overview. **International Journal of Biomedical Science**, v.2, n.2, p.85-100, 2006.

NGUYEN, N.T.; SIEGLER, R.W. Capillary electrophoresis of cardiovascular drugs. **Journal of Chromatography, A**, v.735, p.123-150, 1996.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography, A**, v.666, p.403-419, 1994.

PETERSEN, P.V.; EKELOUND, J.; OLSEN, L.; OVESEN, S.V. Chiral separations of β -blocking drug substances using the Pirkle-type α -Burke 1 chiral stationary phase. **Journal of Chromatography, A**, v.757, n.1/2, p.65-71, 1997.

PREINERSTORFER, B.; HOFFMANN, C.; LUBDA, D.; LÄMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Enantioselective silica-based monoliths modified with a novel aminosulfonic acid-derived strong cation exchanger for electrically driven and pressure-driven capillary chromatography. **Electrophoresis**, v.29, n.8, p.1626-1637, 2008.

PREINERSTORFER, B.; LUBDA, D.; LINDNER, W.; LÄMMERHOFER, M. Monolithic silica-based capillary column with strong chiral cation-exchange type surface modification for enantioselective non-aqueous capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1106, n.1/2, p.94-105, 2006.

REDDY, I.K.; MEHVAR, R., eds. **Chirality in drug design and development**. New York, Basel: Marcel Dekker, 2004. 444p.

REN, X.; DONG, Y.H.A.; SUN, Y.; SUN, Z. Separation of the enantiomers of four chiral drugs by neutral cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, v.49, n.7/8, p.411-414, 1999a.

REN, X.; DONG, Y.; LIU, J.; HUANG, A.; LIU, H.; SUN, Y.; SUN, Z. Separation of chiral basic drugs with sulfobutyl- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis. **Chromatographia**, v.50, n.5/6, p.363-368, 1999b. [Short Communications].

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-789, 2004.

RIBEIRO, A.R.; CASTRO, P.M.L.; TIRITAN, M.E. Chiral pharmaceuticals in the environment. **Environmental Chemistry Letters**, 2012

ROUSSEAU, A.; CHIAP, P.; OPREAN, R.; CROMMEN, J.; FILLET, M.; SERVAIS, A.C. Effect of the nature of the single-isomer anionic CD and the BGE composition

on the enantiomeric separation of β -blockers in NACE. *Electrophoresis*, v.30, n.16, p.2862–2868, 2009.

SALEEM, K.; ALI, I.; KULSUM, U.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Recent developments in HPLC analysis of β -blockers in biological samples. **Journal of Chromatographic Science**. p. 1-12, 2013.

SCHLAUCH, M.; FULDE, K.; FRAHM, A.W. Enantioselective determination of (*R*)- and (*S*)-sotalol in human plasma by on-line coupling of a restricted-access material precolumn to a cellobiohydrolase I-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.775, n.2, p.197–207, 2002.

SCRIBA, G.K.E. Chiral Recognition in Separation Sciences: An Overview. **Chiral Separations: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 970, 2013.

SERVAIS, A.-C.; FILLET, M.; ABUSHOFFA, A.M.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Synergistic effects of ion-pairing in the enantiomeric separation of basic compounds with cyclodextrin derivatives in nonaqueous capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.24, n.3, p.363-369, 2003.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v.30, n.3, p.740-744, 2007.

SILVA Jr., I.J.; BARRETO Jr., A.G.; SANTANA, C.C. Separação cromatográfica quiral de anestésicos a partir de soluções diluídas e concentradas em escala preparativa. **Química Nova**, v.32, n.2, p.359-364, 2009.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: Wiley, 1997. 765p.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. Estereoquímica: moléculas quirais. In: _____. **Química orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. v.1, p.156-189.

SMIRNOVA, I. G.; GIL'DEEVA, G.N.; KUKES, V. G. Optical isomerism and biological activity of pharmaceutical preparations. **Moscow University Chemistry Bulletin**. v.67, n.3, p. 95-102, 2012.

STÄLBERG, O.; HEDELAND, M.; PETTERSSON, C.; WESTERLUND, D. The effect of conductivity tuning in chiral separations by CE; using the hydroxypropyl- β -cyclodextrin in combination with tetraalkylammonium ions. **Chromatographia**, v.48, n.5/6, p.415-412, 1998.

SUBRAMANIAN, G., ed. A practical approach to chiral separations by liquid chromatography. Weinheim: VCH, 1994. 405p.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases: review. **Journal of Chromatography, A**, v.906, p.127–154, 2001.

TANG, Y. Significance of mobile phase composition in enantioseparation of chiral drugs by HPLC on a cellulose-based chiral stationary phase. **Chirality**, v.8, n.1, p. 136-142, 1996.

TANG, Y.; HE, Y.; YAO, T.W.; ZENG, S. Simultaneous determination of the enantiomers of esmolol and its acid metabolite in human plasma by reversed phase liquid chromatography with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.805, n.2, p.249–254, 2004.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, v.19, n.2, p.173-181, 1996.

THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparations for pharmaceutical compounds. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, n.7/8, p.1215-1231, 2005.

TSIOUPI, D.A.; VAN-STADEN, R.I.S.; CHRISTOUDOULOU, C.P.K. Chiral selectors in CE: Recent development and applications. *Electrophoresis*, v. 34, p. 178-204, 2013.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry, Analytical procedures and methods validation**. 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>. Acesso em: 15 mar, 2012.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Reviewer guidance: validation of chromatographic methods**. 1994.

Disponível

em:

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2012.

UNITED STATES Pharmacopoeia 33; USP 33; The National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

VANDENBOSCH, C.; MASSART, D.L.; LINDNER, W. Evaluation of the enantioselectivity of an ovomucoid and a cellulase chiral stationary phase towards a set of β -blocking agents. **Analytica Chimica Acta**, v.270, p.1-12, 1992.

VANDENBOSCH, C.; HAMOIR, T.; MASSART, D.L.; LINDNER, W. Evaluation of the enantioselectivity towards β -blocking agents of the α_1 -acid glycoprotein type chiral stationary phase: chiral AGP. **Chromatographia**, v.33, n.9/10, p.454-462, 1992.

VANDENBOSCH, C.; MASSART, D.L.; LINDNER, W. Evaluation of six chiral stationary phases in LC for their selectivity towards drug enantiomers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.10, n.10-12, p.895-908, 1992.

VARGAS, M.G.; VANDER HEYDEN, Y.; MAFTOUH, M.; MASSART, D.L. Rapid development of the enantiomeric separation of β -blockers by capillary electrophoresis using an experimental design approach. **Journal of Chromatography, A**, v.855, n.2, p.681-693, 1999.

VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VERLEYSEN, K.; SANDRA, P. Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v.19, p. 2798-2833, 1998.

WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry**: analytical methods and pharmacology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. 424p. (Clinical Pharmacology, 18).

WANG, L.-J.; HU, S.Q.; GUO, Q.L.; YANG, G.L.; CHEN, X.G. Di-n-amyI l-tartrate-boric acid complex chiral selector *in situ* synthesis and its application in chiral nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography, A**, v.1218, n.9, p.1300-1309, 2011.

WARD, T.J.; WARD, K.D. Chiral separations: a review of current topics and trends. **Analytical Chemistry**, v.84, n.2, p.626-635, 2012.

WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis: a high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.41, n.6, p.724–738, 2003.

WELCH, C.J. Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories. **Journal of Chromatography, A**, v.666, p.3-26, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular disease**. Disponível em: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/. Acesso em: 20 jul. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2012 report**. Geneva, 2012. Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf. Acesso em: 15 jul. 2012.

XU, Y. In the classroom. Tutorial: Capillary electrophoresis. **The Chemical Educator**. v.1, n.2, p. 1-4, 1996.

YANG, G.S.; CHEN, D.M.; YANG, Y.; TANG, B.; GAO, J.J.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; KOPPENHOEFER, B. Enantioseparation of some clinically used drugs by capillary electrophoresis using sulfated β -cyclodextrin as a chiral selector. **Chromatographia**, v.62, n.7/8, p.441-445, 2005.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Chromatography, A**, v.906, p.105-125, 2001.

YOUNES, A.A.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y.V. Chiral separations in normal phase liquid chromatography: Enantioselectivity of recently commercialized polysaccharide-based selectors. Part I: Enantioselectivity under generic screening conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, n.3, p.414–423, 2011a.

-YOUNES, A.A.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y.V. Chiral separations in normal-phase liquid chromatography: Enantioselectivity of recently commercialized polysaccharide-based selectors. Part II. Optimization of enantioselectivity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, n.3, p.521–537, 2011a.

ZARBL, E.; LÄMMERHOFER, M.; WOSCHEK, A.; HAMMERSCHMIDT, F.; PARENTI, C.; CANNAZZA, G.; LINDNER, W. Strong versus weak chiral cation exchangers: comparative evaluation for enantiomer separation of chiral bases by non-aqueous CEC. **Journal of Separation Science**, v.25, n.15/17, p.1269-1283, 2002.

ZHANG, HL.; SHAO, H.; YOUMEI, A.; ZHANG, ZZ. Optimized conditions of enantioseparation of β -blockers by CZE using carboxymethyl- β -cyclodextrin as chiral selector. **Chromatographia**, v.68, n.7/8, p.653–658, 2008. [Short Communication].

ZHONG, W.; YEUNG, E.S. Combinatorial enantiomeric separation of diverse compounds using capillary array electrophoresis. **Electrophoresis**, v.23, p.2996-3005, 2002.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE ESMOLOL POR

CLAE EM FASE REVERSA

Ensaio 43

Ensaio 44

Ensaio 45

Ensaio 46

Ensaio 47

Ensaio 48

Ensaio 49

Ensaio 50

Ensaio 51

Quadro 1 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de esmolol por CLAE em fase reversa utilizando fosfato de sódio

Ensaio 43 a 51: FM= **Ensaio 43:** ACN: NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,0:EtOH (42:40:18); **Ensaio 44:** NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7,0:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 45:** NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 46:** ACN: NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0:EtOH (42:40:18); **Ensaio 47:** ACN: NaH₂PO₄ 100 mM, pH 2,1:EtOH (42:40:18); **Ensaio 48:** NaH₂PO₄ 100 mM, pH 2,1:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 49:** NaH₂PO₄ 50 mM, pH 2,1:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 50:** ACN: NaH₂PO₄ 50 mM, pH 2,1:EtOH (42:40:18); **Ensaio 51:** NaH₂PO₄ 75 mM, pH 4,42:ACN:EtOH (60:28:12)). Vazão 0,5 mL.min⁻¹; Temperatura 25 °C; injetados 20 µL de cloridrato de esmolol 200 µg/mL.

Ensaio 52

Ensaio 53

Ensaio 54

Ensaio 55

Ensaio 56

Ensaio 57

Ensaio 58

Ensaio 59

Ensaio 60

Quadro 2 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de esmolol por CLAE em fase reversa utilizando perclorato de potássio

Ensaios 52 a 60: FM= **Ensaio 52:** KClO_4 75 mM, pH 4,52:ACN:EtOH (60:28:12); **Ensaio 53:** KClO_4 100 mM, pH 2,12:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 54:** ACN: KClO_4 100 mM, pH 2,12:EtOH (42:40:18); **Ensaio 55:** KClO_4 50 mM, pH 2,08:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 56:** ACN: KClO_4 50 mM, pH 2,08:EtOH (42:40:18); **Ensaio 57:** ACN: KClO_4 50 mM, pH 6,96:EtOH (42:40:18); **Ensaio 58:** KClO_4 50 mM, pH 6,96:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 59:** KClO_4 100 mM, pH 6,90:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 60:** ACN: KClO_4 100 mM, pH 6,90:EtOH (42:40:18). Vazão $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Temperatura 25°C ; injetados $20 \mu\text{L}$ de cloridrato de esmolol $200 \mu\text{g/mL}$

Ensaio 63

Ensaio 64

Ensaio 65

Ensaio 66

Ensaio 67

Ensaio 68

Ensaio 69

Ensaio 70

Ensaio 71

Ensaio 72

Ensaio 73

Ensaio 74

Quadro 3 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de esmolol por CLAE em fase reversa utilizando DEA

Ensaio 63 a 75: **Ensaio 63:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN:DEA (80:20:0,02); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 64:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN:DEA (80:20:0,02); Vazão 0,6 mL.min^{-1} ; **Ensaio 65:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN:DEA (80:20:0,04); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 66:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN:DEA (80:20:0,04); Vazão 0,6 mL.min^{-1} ; **Ensaio 67:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN:DEA: CH_3COOH (80:20:0,04:0,04); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 68:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08: ACN:DEA: CH_3COOH (80:20:0,04:0,04); Vazão 0,6 mL.min^{-1} ; **Ensaio 69:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,06:ACN:DEA (80:20:0,1); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 70:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,06:ACN:DEA (62:38:0,1); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 71:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,06: ACN:DEA (67:33:0,1); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 72:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08: ACN:DEA (80:20:0,1); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 73:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,18: ACN:DEA (80:20:0,2); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 74:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN :DEA (80:20:0,2); Vazão 0,5 mL.min^{-1} ; **Ensaio 75:** FM= KClO_4 100 mM, pH 2,08:ACN:DEA : CH_3COOH (80:20:0,2:0,2); Vazão 0,5 mL.min^{-1} . Temperatura 25 °C; injetados 20 μL de cloridrato de esmolol 200 $\mu\text{g/mL}$.

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE ESMOLOL POR

CLAE EM FASE NORMAL

Quadro 4 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de esmolol por CLAE em fase normal sem DEA

Ensaios 1 a 16: **Ensaio 1:** FM= Hex:EtOH (99:1); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 2:** FM= Hex:EtOH (90:10); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 3:** FM= Hex:EtOH (80:20); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 4:** FM= Hex:EtOH (70:30); Vazão 0,8 mL.min⁻¹; **Ensaio 5:** FM= Hex:EtOH (50:50); Vazão 0,6 mL.min⁻¹; **Ensaio 6:** FM= EtOH:Hex (80:20); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 7:** FM= EtOH:Hex (90:10); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 8:** FM= EtOH (100); Vazão 0,4 mL.min⁻¹; **Ensaio 9:** FM= EtOH:Hex (90:10); Vazão 0,2 mL.min⁻¹; **Ensaio 10:** FM= EtOH:Hex (80:20); Vazão 0,3 mL.min⁻¹; **Ensaio 11:** FM= EtOH:MeOH:Hex (64:16:20); Vazão 0,6 mL.min⁻¹; **Ensaio 12:** FM= EtOH:MeOH:Hex (72:18:10); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 13:** FM= EtOH:MeOH:Hex (40:40:20); Vazão 0,7 mL.min⁻¹; **Ensaio 14:** FM= EtOH:Hex:MeOH (72:20:8); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 15:** FM= MeOH: Hex:EtOH (64:20:16); Vazão 0,8

mL.min⁻¹; **Ensaio 16:** FM= EtOH:Hex:MeOH (64:20:16); Vazão 0,6 mL.min⁻¹. Temperatura 25 °C; injetados 20 µL de cloridrato de esmolol 200 µg/mL

Ensaio 17

Ensaio 18

Ensaio 19

Ensaio 20

Ensaio 21

Ensaio 22

Ensaio 23

Ensaio 24

Ensaio 25

Ensaio 26

Ensaio 27

Ensaio 28

Ensaio 29

Ensaio 30

Ensaio 31

Ensaio 32

Ensaio 33

Ensaio 34

Ensaio 35

Ensaio 36

Quadro 5 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de esmolol por CLAE em fase normal com DEA

Ensaios 17 a 39: **Ensaio 17:** FM= EtOH:Hex:DEA (80:20:0,16); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 18:** FM= EtOH:Hex:DEA (70:30:0,14); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 19:** FM= Hex:EtOH:DEA (50:50:0,1); Vazão 0,7 mL.min⁻¹; **Ensaio 20:** FM= Hex:EtOH:DEA (70:30:0,06); Vazão 0,9 mL.min⁻¹; **Ensaio 21:** FM= Hex:EtOH:DEA (90:10:0,2); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 22:** FM= Hex:EtOH:DEA (90:10:0,2); Vazão 1,3 mL.min⁻¹; **Ensaio 23:** FM= Hex:EtOH:DEA (90:10:0,2); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 24:** FM= Hex:EtOH:DEA (80: 20:0,2); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 25:** FM= Hex:EtOH:DEA (80:20:0,2); Vazão 1,1 mL.min⁻¹; **Ensaio 26:** FM= Hex:EtOH:DEA (70:30:0,2); Vazão 0,8 mL.min⁻¹; **Ensaio 27:** FM= Hex:EtOH:DEA (70:30:0,2); Vazão 0,9 mL.min⁻¹; **Ensaio 28:** FM= Hex:EtOH:DEA (75:25:0,2); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 29:** FM= Hex:EtOH:DEA (77:23:0,184); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 30:** FM= Hex:EtOH:DEA (85:15:0,2); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 31:** FM= Hex:EtOH:DEA (83:17:0,153); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 32:** FM= Hex:EtOH:DEA (84:16:0,144); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 33:** FM= Hex:EtOH:DEA (82:18:0,162); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 34:** FM= Hex:EtOH:DEA (81:19:0,171); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 35:** FM= Hex:EtOH:DEA (74:26:0,208); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 36:** FM= Hex:EtOH:DEA (73:27:0,216); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 37:** FM= Hex:EtOH:DEA (72:28:0,224); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 38:** FM= Hex:EtOH:DEA (71:29:0,232); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 39:** FM= Hex:EtOH:DEA (76:24:0,192); Vazão 1,0 mL.min⁻¹. Temperatura 25 °C; injetados 20 µL de cloridrato de esmolol 200 µg/mL

APÊNDICE C – CROMATOGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL POR

CLAE EM FASE REVERSA

Quadro 6 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de sotalol por CLAE em fase reversa utilizando fosfato de sódio

Ensaios 6 a 14: FM= **Ensaio 6:** ACN: NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7:EtOH (42:40:18); **Ensaio 7:** NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 8:** NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 9:** ACN: NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7:EtOH (42:40:18); **Ensaio 10:** ACN: NaH₂PO₄ 100 mM, pH 2,1:EtOH (42:40:18); **Ensaio 11:** NaH₂PO₄ 100 mM, pH 2,1:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 12:** NaH₂PO₄ 50 mM, pH 2,1:ACN:EtOH (80:14:6); **Ensaio 13:** ACN: NaH₂PO₄ 50 mM, pH 2,1:EtOH (42:40:18); **Ensaio 14:** NaH₂PO₄ 75 mM, pH 4,52:ACN:EtOH (60:28:12). Vazão 0,5 mL.min⁻¹; Temperatura 25 °C; injetados 20 µL de cloridrato de esmolol 200 µg/mL.

Quadro 7 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de totalol por CLAE em fase reversa utilizando perclorato de potássio

Ensaio 15 a 23: FM= **Ensaio 15:** KClO_4 75 mM, pH 4,52 : ACN : EtOH (60:28:12); **Ensaio 16:** KClO_4 100 mM, pH 2,12 : ACN : EtOH (80:14:6); **Ensaio 17:** ACN : KClO_4 100 mM, pH 2,12 : EtOH (42:40:18); **Ensaio 18:** KClO_4 50 mM, pH 2,08 : ACN : EtOH (80:14:6); **Ensaio 19:** ACN : KClO_4 50 mM, pH 2,08 : EtOH (42:40:18); **Ensaio 20:** ACN : KClO_4 50 mM, pH 6,96 : EtOH (42:40:18); **Ensaio 21:** KClO_4 50 mM, pH 6,96 : ACN : EtOH (80:14:6); **Ensaio 22:** KClO_4 100 mM, pH 6,90 : ACN : EtOH (80:14:6); **Ensaio 23:** ACN : KClO_4 100 mM, pH 6,90 : EtOH (42:40:18). Vazão $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Temperatura 25°C ; injetados $20 \text{ }\mu\text{L}$ de cloridrato de esmolol $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$

Quadro 8 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de totalol por CLAE em fase reversa utilizando perclorato de potássio 10 e 25 mM

Ensaio 27 a 34: FM= **Ensaio 27:** KClO_4 10 mM, pH 6,94: ACN (80:20); **Ensaio 28:** KClO_4 10 mM, pH 6,94: ACN (40:60); **Ensaio 29:** KClO_4 25 mM, pH 6,93: ACN (40:60); **Ensaio 30:** KClO_4 25 mM, pH 6,93: ACN (80:20); **Ensaio 31:** KClO_4 25 mM, pH 2,05: ACN (80:20); **Ensaio 32:** KClO_4 25 mM, pH 2,05: ACN (40:60); **Ensaio 33:** KClO_4 10 mM, pH 2,06: ACN (40:60); **Ensaio 34:** KClO_4 10 mM, pH 2,06: ACN (80:20)). Vazão $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Temperatura 25°C ; injetados $20 \mu\text{L}$ de cloridrato de esmolol $200 \mu\text{g/mL}$

APÊNDICE D – CROMATOGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL POR

CLAE EM FASE NORMAL

Quadro 9 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de sotalol por CLAE em fase normal. Ensaios 1 a 15: **Ensaio 1:** Hex:EtOH (99:1); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 2:** Hex:EtOH (90:10); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 3:** Hex:EtOH (80:20); Vazão 1,0 mL.min⁻¹; **Ensaio 4:** Hex:EtOH (70:30); Vazão 0,8 mL.min⁻¹; **Ensaio 5:** Hex:EtOH (50:50); Vazão 0,6 mL.min⁻¹; **Ensaio 6:** EtOH:Hex (80:20); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 7:** EtOH:Hex (90:10); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 8:** EtOH (100); Vazão 0,4 mL.min⁻¹; **Ensaio 9:** EtOH:Hex (90:10); Vazão 0,2 mL.min⁻¹; **Ensaio 10:** EtOH:MeOH:Hex (64:16:20); Vazão 0,6 mL.min⁻¹; **Ensaio 11:** EtOH:MeOH:Hex (72:18:10); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 12:** EtOH:MeOH:Hex (40:40:20); Vazão 0,7 mL.min⁻¹; **Ensaio 13:** EtOH:Hex:MeOH (72:20:8); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 14:** EtOH:Hex:DEA (80:20:0,16); Vazão 0,5 mL.min⁻¹; **Ensaio 15:** EtOH:Hex:DEA (70:30:0,14); Vazão 0,5 mL.min⁻¹. Temperatura 25 °C; injetados 20 µL de cloridrato de esmolol 200 µg/mL

APÊNDICE E – CROMATOGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL POR

CLAE UTILIZANDO COLUNA BURKE

Quadro 10 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de sotalol utilizando coluna Burke®
Ensaio 1 a 9: **Ensaio 1:** MeOH: água com 0,1% de TEA em pH 2,97 (20:80); **Ensaio 2:** MeOH: água com 0,1% de TEA em pH 2,97 (50:50); **Ensaio 3:** MeOH: água com 0,1% de TEA em pH 2,97 (80:20); **Ensaio 4:** MeOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (80:20); **Ensaio 5:** MeOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (50:50); **Ensaio 6:** MeOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (20:80); **Ensaio 7:** EtOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (10:90); **Ensaio 8:** EtOH: água com 0,015 M acetato de amônio, pH 5 (90:10); **Ensaio 9:** EtOH 0,02M acetato de amônio : diclorometano (50:50)

APÊNDICE F – CROMATOGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL POR

CLAE UTILIZANDO COLUNA WHELK®

Quadro 11 – Cromatogramas referentes aos ensaios de cloridrato de sotalol realizados com coluna Whelk®

Ensaios 1 a 15: **Ensaio 1:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (20:80); **Ensaio 2:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (80:20); **Ensaio 3:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (95:5); **Ensaio 4:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (50:50); **Ensaio 5:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (60:40); **Ensaio 6:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (70:30); **Ensaio 7:** MeOH: H₂O com 0,1% TEA pH final 2,75 (75:25); **Ensaio 8:** MeOH: H₂O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (80:20); **Ensaio 9:** MeOH: H₂O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (50:50); **Ensaio 10:** MeOH: H₂O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (20:80); **Ensaio 11:** EtOH: H₂O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (20:80); **Ensaio 12:** EtOH: H₂O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (50:50); **Ensaio 13:** EtOH: H₂O com 0,015M acetato de amônio, pH 4,9 (80:20)

APÊNDICE G – ELETROFEROGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE ESMOLOL POR

ELETROFORESE CAPILAR

Ensaio 9

Ensaio 10

Ensaio 11

Ensaio 12

Ensaio 13

Ensaio 14

Ensaio 15

Ensaio 16

Ensaio 17

Ensaio 18

Quadro 12 – Eletroferogramas referentes aos ensaios de cloridrato de esmolol por eletroforese capilar

Ensaios 1 a 24: **Ensaio 1:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 20 kV; **Ensaio 2:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 15 kV; **Ensaio 3:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 10 kV; **Ensaio 4:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 10 kV; **Ensaio 5:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 97 mM : 9,8 mM β -CD hidratada, pH 2,16 (9:1); 10 kV; **Ensaio 6:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,18; 10 kV; **Ensaio 7:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,18; 12 kV; **Ensaio 8:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,18 : MeOH (95:5); 10 kV; **Ensaio 9:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 20,0 mM β -CD hidratada, pH 2,05; 10 kV; **Ensaio 10:** 0,3 psi; 3 seg; KClO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,03; 8 kV; **Ensaio 11:** KClO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,03; 10 kV; **Ensaio 12:** 0,3 psi; 3 seg; KClO_4 75 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,02; 8 kV; **Ensaio 13:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,57*; 15 kV; **Ensaio 14:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 10,0 mM β -CD hidratada, pH 2,57*; 18 kV; **Ensaio 15:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 20 mM + 10,0 mM 2HP- β -CD, pH 1,95*; 15 kV; **Ensaio 16:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 20 mM + 10,0 mM 2HP- β -CD, pH 4,28*; 15 kV; **Ensaio 17:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 100 mM + 10,0 mM 2HP- β -CD, pH 2,48*; 12 kV; **Ensaio 18:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 100 mM + 10,0 mM β -CD sulfatada, pH 2,25*; 8 kV; **Ensaio 19:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 100 mM + 15,0 mM β -CD sulfatada, pH 2,48*; 12 kV; **Ensaio 20:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 100 mM + 15,0 mM β -CD sulfatada, pH 2,47*; 6 kV; **Ensaio 21:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 100 mM + 15,0 mM β -CD sulfatada, pH 2,47*; 8 kV; **Ensaio 22:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 100 mM + 15,0 mM 2HP- β -CD, pH 2,48 :

MeOH (95:5)*; 12 kV; **Ensaio 23:** 0,5 psi; 5 seg; NaH₂PO₄ 25 mM pH 6,01*; 25 kV; **Ensaio 24:** 0,5 psi; 5 seg; NaH₂PO₄ 25 mM pH 6,01*; 30 kV

APÊNDICE H – ELETROFEROGRAMAS REFERENTES AOS ENSAIOS

REALIZADOS PARA SEPARAÇÃO DE CLORIDRATO DE SOTALOL POR

ELETROFORESE CAPILAR

Quadro 13 – Eletroferogramas referentes aos ensaios de cloridrato de sotalol por eletroforese capilar
 Ensaios 1 a 29: **Ensaio 1:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 20 kV; **Ensaio 2:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 15 kV; **Ensaio 3:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 25 mM + 3,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 10 kV; **Ensaio 4:** 0,3 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 10 kV; **Ensaio 5:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 50 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,3; 8 kV; **Ensaio 6:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 75 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,15; 8 kV; **Ensaio 7:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 75 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,15; MeOH (95:5); 8 kV; **Ensaio 8:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 75 mM + 7,9 mM β -CD hidratada, pH 2,15; MeOH (90:10); 10 kV; **Ensaio 9:** 0,5 psi; 3 seg; NaH_2PO_4 75 mM + 9 mM β -CD hidratada, pH

2,00; 8 kV; **Ensaio 10:** 0,5 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada, pH 2,18; 10 kV; **Ensaio 11:** 0,5 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 50 mM + 20 mM β-CD hidratada, pH 2,05; 10 kV; **Ensaio 12:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 50 mM + 20 mM β-CD hidratada, pH 2,05; 8 kV; **Ensaio 13:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 75 mM + 20 mM β-CD hidratada, pH 2,05; 8 kV; **Ensaio 14:** 0,3 psi; 3 seg; KClO₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,03; 8 kV; **Ensaio 15:** 0,3 psi; 3 seg; KClO₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,03; 10 kV; **Ensaio 16:** 0,3 psi; 3 seg; KClO₄ 50 mM + 20 mM β-CD hidratada pH 2,03; 10 kV; **Ensaio 17:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,57*; 15 kV; **Ensaio 18:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 50 mM + 10 mM β-CD hidratada pH 2,57*; 18 kV; **Ensaio 19:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 20 mM + 10 mM 2-HP-β-CD pH 1,95*; 15 kV; **Ensaio 20:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 20 mM + 10 mM 2-HP-β-CD pH 4,28*; 15 kV; **Ensaio 21:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 10 mM HP-β-CD pH 2,48*; 12 kV; **Ensaio 22:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 10 mM β-CD sulfatada pH 2,25; 8 kV; **Ensaio 23:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 15 mM 2-HP-β-CD pH 2,48; 12 kV; **Ensaio 24:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 15 mM 2-HP-β-CD pH 2,48; 8 kV; **Ensaio 25:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 15 mM β-CD sulfatada pH 2,47; 6 kV; **Ensaio 26:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 15 mM β-CD sulfatada pH 2,47; 8 kV; **Ensaio 27:** 0,3 psi; 3 seg; NaH₂PO₄ 100 mM + 15 mM 2HP-β-CD pH 2,48 : MeOH (95:5); 12 kV; **Ensaio 28:** 0,5 psi; 5 seg; NaH₂PO₄ 25 mM pH 6,01*; 25 kV; **Ensaio 29:** 0,5 psi; 5 seg; NaH₂PO₄ 25 mM pH 6,01*; 30 kV.