

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP- DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

*Análise Enantiosseletiva da Propafenona e de
seus Metabólitos.*

Luis Renato Pires de Abreu.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras
de Ribeirão Preto-USP como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM CIÊNCIAS-ÁREA: Química

1998

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP- DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

*Análise Enantiosseletiva da Propafenona e de
seus Metabólitos.*

Orientado: Luis Renato Pires de Abreu.
Orientadora: Dra. Pierina Sueli Bonato.

1998

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Abreu, Luis Renato Pires de

Análise enantiosseletiva da propafenona e de seus
metabólitos.

Ribeirão Preto, 1998.

106 p. : il. ; 30cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de
concentração: Química.

Orientador: Bonato, Pierina Sueli.

1. Propafenona – Resolução.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
"Campus" de Ribeirão Preto

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUIS RENATO PIRES DE ABREU, APRESENTADA A FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, NO DIA 09 DE NOVEMBRO DE 1998.

COMISSÃO JULGADORA:


Prof. Dra. PIERINA SUELI BONATO
(Orientadora)


Prof. Dra. CAROL HOLLINGWORTH COLLINS


Prof. Dr. JOÃO LUIS CALLEGARI LOPES

Dedicatória

“Aos meus irmãos, Rodrigo e Luciana...”

Meus eternos “colaboradores”.

Agradeço
à DEUS por todo meu aprendizado.

“As boas qualidades dos animais mostram-se no vigor do corpo; as dos homens na excelência do caráter.”

Demócrito de Abdera
(460-370 a.C.)

Aos meus pais, que me deram a vida ...

Ao Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes por estar sempre presente nos momentos mais difíceis da minha vida.

À Marisa Biagini Lopes, minha mãe com açúcar, pelo carinho e amizade.

Ao meu primo, companheiro, sempre amigo e quase irmão Alcimar Alciati Balro, fiel escudeiro.

Aos amigos Samuel Grillo Negrin e Marco Antônio Vieira de Moraes cuja amizade, apesar da distância, esteve sempre próxima.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato, pela dedicação, confiança e seriedade com que transmitiu seus conhecimentos, serei eternamente grato.

À todos os professores do laboratório de Química Analítica, em especial ao Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes Guimarães e ao Prof. Dr. Roberto Santana da Silva pelos conhecimentos a mim transferidos na realização do plano PAE.

À todos os funcionários do laboratório de Química Analítica, pelo suporte técnico indispensável ao desenvolvimento do trabalho, em especial ao Sr. Luiz Feiteiro, pelo importante papel que desempenha em todas as atividades.

Ao Sr. Roberto de Carvalho, pela participação no desenvolvimento desse trabalho.

À Sra. Maria Perpétua Del Lama, pelo modelo de eficiência e personalidade que representa.

À Srta. Rosana Frangiosi, pela disponibilidade e atenção com que cuidou das atividades envolvidas no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de Química Analítica, em especial a pós-graduanda Cristiane Masseto de Gaitani pela colaboração nos estágios iniciais deste estudo.

Aos colegas da pós-graduação, especialmente Rodrigo Cássio Sola Veneziani, Fábio Ermínio Mingatto e Mônica Maruno pela amizade cultivada no decorrer desses anos.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Lanchote, Profa. Dra. Marilda das Dores Assis e Profa. Dra. Carol H. Collins pela importante contribuição ao estudo realizado.

À todas as secretárias do Departamento de Química e Filosofia, em especial à Maria Inês e à Bel, pelos importantes serviços prestados.

À Bernadete e Cristina pela correção bibliográfica deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pela concessão do uso dos laboratórios e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela confiança em mim depositada na concessão da bolsa de estudo.

À FAPESP pelo suporte financeiro necessário para o desenvolvimento do projeto.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tabelas.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii

INTRODUÇÃO..... 1

1.1. Quiralidade.....	1
1.2. Fármacos quirais.....	4
1.3. Separação de enantiômeros.....	7
1.3.1. Procedimentos indiretos de separação.....	7
1.3.2. Procedimentos diretos de separação.....	8
1.4. Fases estacionárias quirais.....	9
1.4.1. Mecanismos de discriminação quiral.....	9
1.4.2. Tipos de fases estacionárias quirais.....	12
-Fases baseadas em polímeros helicoidais.....	12
-Fases contendo cavidades quirais.....	17
-Fases quimicamente ligadas.....	19
-Fases por troca de ligante.....	21
-Fases protéicas.....	22
1.5. A Propafenona e seus metabólitos.....	26
1.6. Separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos.....	29

OBJETIVOS..... 32

MATERIAIS E MÉTODOS..... 33

3.1. Equipamentos e colunas cromatográficas.....	33
3.2. Solventes e reagentes.....	33
3.3. Fármaco e metabólitos.....	34
3.4. Avaliação das colunas quirais.....	34
3.4.1. Cálculos dos parâmetros cromatográficos.....	35
3.4.2. Determinação da configuração absoluta e ordem de eluição dos enantiômeros da PPF-5OH e PPF-NOR.....	36
3.5. Análise da PPF e PPF-5OH em plasma.....	37
3.5.1. Procedimento de extração.....	38

3.5.2. Validação do método e análise estatística.....	39
-Curva de calibração e linearidade.....	40
-Recuperação.....	41
-Exatidão e repetibilidade.....	41
-Limite de quantificação.....	42
-Seletividade.....	42
3.5.3. Aplicação do método.....	43

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 44

4.1. Avaliação das colunas quirais.....	44
4.1.1. Avaliação das colunas que operam em condições de fase reversa.....	46
4.1.1.1. Avaliação da coluna ULTRON ES-OVM®.....	47
4.1.1.2. Avaliação da coluna CHIRAL AGP®.....	55
4.1.1.3. Avaliação da coluna CHIRALCEL ODR®.....	60
4.1.2. Avaliação das colunas que operam em condições de fase normal.....	64
4.1.2.1. Avaliação da coluna CHIRALPAK AD®.....	66
4.1.2.2. Avaliação da coluna CHIRALCEL OD-H®.....	71
4.2. Determinação da configuração absoluta e da ordem de eluição da PPF e de seus metabólitos.	75
4.3. Análise enantiosseletiva da PPF e PPF-5OH em plasma.....	77
4.4. Validação do método e análise estatística.....	79
4.4.1. Recuperação.....	80
4.4.2. Curva de calibração.....	81
4.4.3. Linearidade.....	83
4.4.4. Repetibilidade e exatidão.....	84
4.4.5. Limite de quantificação.....	85
4.4.6. Seletividade.....	87
4.5. Aplicação do método.....	89
4.6. Comentários finais.....	91

CONCLUSÕES..... 95

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 97

Lista de Abreviaturas

CLAE	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
FEQ	<i>Fase estacionária quiral</i>
CD	<i>Ciclodextrina</i>
BSA	<i>Soroalbumina bovina</i>
HSA	<i>Soroalbumina humana</i>
α_1-AGP	<i>α_1-glicoproteína ácida</i>
μL	<i>Microlitros</i>
μg	<i>Microgramas</i>
μm	<i>Micrometros</i>
Da	<i>Daltons</i>
PPF	<i>Propafenona</i>
PPF-5OH	<i>5-hidroxiopropafenona</i>
PPF-NOR	<i>N-despropilpropafenona</i>
L	<i>Litros</i>
kg	<i>Quilogramas</i>
mL	<i>Militros</i>
ng	<i>Nanogramas</i>
mg	<i>Miligramas</i>
Å	<i>Angstroms</i>
n	<i>Número de amostras</i>
Part	<i>Partículas</i>
Máx	<i>Máxima</i>
PI	<i>Ponto isoelétrico</i>
DC	<i>Dicroísmo circular</i>
R	<i>Recuperação</i>
RP-18	<i>Coluna C₁₈</i>
UV-Vis	<i>Utra violeta-visível</i>
α	<i>Fator de separação</i>
k	<i>Fator de retenção</i>
t_{R1}	<i>Tempo de retenção para o primeiro enantiômero eluido</i>
t_{R2}	<i>Tempo de retenção para o segundo enantiômero eluido</i>
t_m	<i>Tempo de retenção de um composto não retido na coluna</i>
k₁	<i>Fator de retenção para o primeiro enantiômero eluido</i>
k₂	<i>Fator de retenção para o segundo enantiômero eluido</i>
S	<i>Estimativa do desvio padrão</i>
DEA	<i>Dietilamina</i>
TFA	<i>Ácido trifluoroacético</i>
v/v	<i>Volume/Volume</i>
r	<i>Coefficiente de correlação</i>
h	<i>Horas</i>
min	<i>Minutos</i>

Lista de Figuras

FIGURA 1.	<i>Enantiômeros na sua forma mais comum, carbono assimétrico.....</i>	3
FIGURA 2.	<i>Exemplos de fármacos quirais.....</i>	6
FIGURA 3.	<i>Modelo clássico de interação enantiosseletiva em três pontos de contato.....</i>	11
FIGURA 4.	<i>Algumas fases estacionárias quirais baseadas em derivados de celulose e amilose.....</i>	14
FIGURA 5.	<i>Mecanismo de inclusão nas CDs.....</i>	18
FIGURA 6.	<i>Interações tipo PIRKLE.....</i>	20
FIGURA 7.	<i>Estrutura da propafenona (PPF) e de seus dois metabólitos ativos.....</i>	27
FIGURA 8.	<i>Preparação da amostra para análise cromatográfica.....</i>	35
FIGURA 9.	<i>Procedimento de extração.....</i>	39
FIGURA 10.	<i>Grupos de seletividade dos solventes normalmente empregados em CLAE.....</i>	46
FIGURA 11.	<i>Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna ULTRON ES-OVM[®].....</i>	50
FIGURA 12.	<i>Resolução dos enantiômeros da PPF-5OH na coluna ULTRON ES-OVM[®].....</i>	55
FIGURA 13.	<i>Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRAL AGP[®].....</i>	57
FIGURA 14.	<i>Resolução dos enantiômeros da PPF (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRAL AGP[®].....</i>	59
FIGURA 15.	<i>Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALCEL ODR[®].....</i>	61
FIGURA 16.	<i>Resolução dos enantiômeros da PPF (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRALCEL OD-R[®].....</i>	64

- FIGURA 17.** *Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALPAK AD[®]..... 67*
- FIGURA 18.** *Resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRALPAK AD[®]..... 71*
- FIGURA 19.** *Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALCEL OD-H[®]..... 74*
- FIGURA 20.** *Resolução dos enantiômeros da (A)-PPF e (B)-PPF-5OH na coluna CHIRALCEL OD-H[®]..... 75*
- FIGURA 21.** *Cromatogramas indicando a resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH em plasma..... 78*
- FIGURA 22.** *Curva de Calibração para análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH..... 82*
- FIGURA 23.** *Avaliação da linearidade do método desenvolvido para análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH..... 83*
- FIGURA 24.** *Cromatograma indicando a resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH na amostra obtida de um voluntário..... 90*
- FIGURA 25.** *Resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRALPAK AD[®]..... 93*

Lista de Tabelas

TABELA 1.	<i>Alguns compostos resolvidos nas colunas baseadas em derivados de celulose.....</i>	16
TABELA 2.	<i>Alguns compostos resolvidos nas colunas baseadas em CDs.....</i>	19
TABELA 3.	<i>Alguns compostos resolvidos utilizando fases quirais do tipo π-doador e π-receptor.....</i>	21
TABELA 4.	<i>Alguns compostos resolvidos nas fases por troca de ligante.....</i>	22
TABELA 5.	<i>Parâmetros utilizados na validação do método e análise estatística.....</i>	40
TABELA 6.	<i>Principais características dos solventes utilizados para alterar a seletividade das fases móveis.....</i>	45
TABELA 7.	<i>Características e limites de operação das colunas que operam em condições de fase reversa.....</i>	48
TABELA 8.	<i>Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna ULTRON ES-OVM[®].....</i>	49
TABELA 9.	<i>Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRAL AGP[®].....</i>	56
TABELA 10.	<i>Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL OD-R[®].....</i>	60
TABELA 11.	<i>Características e limites de operação das colunas que operam em condições de fase normal.....</i>	65
TABELA 12.	<i>Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD[®].....</i>	66
TABELA 13.	<i>Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL OD-H[®].....</i>	73
TABELA 14.	<i>Ordem de eluição da PPF e de seus metabólitos.....</i>	77

TABELA 15.	<i>Resultados obtidos na avaliação da recuperação do método desenvolvido.....</i>	81
TABELA 16.	<i>Resultados da avaliação da repetibilidade e exatidão interensaios.....</i>	86
TABELA 17.	<i>Resultados da avaliação da repetibilidade e exatidão intra-ensaio.....</i>	86
TABELA 18.	<i>Fármacos avaliados como interferentes do método desenvolvido.....</i>	88
TABELA 19.	<i>Comparação dos métodos baseados em fases estacionárias quirais.....</i>	92

Resumo

Várias colunas utilizando seletores quirais baseados em derivados de amilose (CHIRALPAK AD[®]) ou celulose (CHIRALCEL OD-H[®] e CHIRALCEL ODR[®]), e em proteínas (CHIRAL AGP[®] e ULTRON ES-OVM[®]), foram avaliadas para a resolução dos enantiômeros da propafenona (PPF), 5-hidroxiopropafenona (PPF-5OH) e N-despropilpropafenona (PPF-NOR). Além disso, foi investigada a influência da composição da fase móvel na resolução da PPF e de seus principais metabólitos. Os enantiômeros da PPF foram resolvidos em todas as colunas, exceto na coluna ULTRON ES-OVM[®]. Esta coluna, as colunas CHIRALPAK AD[®] e CHIRALCEL OD-H[®] foram adequadas para a resolução dos enantiômeros da PPF-5OH. Os enantiômeros da PPF-NOR foram resolvidos nas colunas CHIRALPAK AD[®], CHIRAL AGP[®] e CHIRALCEL ODR[®]. A coluna CHIRALPAK AD[®] foi a única que apresentou resolução adequada da PPF e de seus metabólitos, contudo os picos obtidos para a PPF-NOR não foram simétricos nas condições empregadas.

Finalmente, foi desenvolvido um método enantiosseletivo para a determinação simultânea dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH em plasma. Após a extração líquido-líquido com diclorometano, os enantiômeros foram resolvidos na coluna CHIRALPAK AD[®], utilizando a mistura hexano-etanol (88:12) acrescida de 0,1% de dietilamina como fase móvel, com detecção em 315 nm. O procedimento de extração apresentou recuperações absolutas de 62,9% e 61,3% para a (R)- e (S)-PPF, respectivamente, e de 57,6% e 56,5% para (R)- e (S)-PPF-5OH, respectivamente.

O método permitiu a determinação dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH no intervalo de concentrações plasmáticas de 25-1250 ng/mL, podendo ser utilizados em estudos clínicos de disposição cinética.

Abstract

Several columns, which are based on amylose (CHIRALPAK AD[®]) or cellulose (CHIRALCEL OD-H[®] and CHIRALCEL OD-R[®]) derivatives, and on proteins (CHIRAL AGP[®] and ULTRON ES-OVM[®]) as the chiral selectors, were evaluated for the resolution of the enantiomers of propafenone (PPF), 5-hydroxypropafenone (PPF-5OH) and N-despropylpropafenone (PPF-NOR). Furthermore, the influence of the mobile phase composition on the resolution of PPF and of its main metabolites was investigated. The enantiomers of PPF were resolved on all columns, except for the ULTRON ES-OVM[®]. This column, the CHIRALPAK AD[®] and the CHIRALCEL OD-H[®] columns were suitable for the resolution of the PPF-5OH enantiomers. The PPF-NOR enantiomers were resolved on the CHIRALPAK AD[®], CHIRAL AGP[®] and CHIRALCEL OD-R[®] columns. The CHIRALPAK AD[®] column proved to be the only one useful for the resolution of PPF and of its main metabolites, although the peaks obtained for PPF-NOR were not symmetrical under the conditions investigated.

Finally, an enantioselective high-performance liquid chromatography method was developed for the simultaneous determination of PPF and PPF-5OH enantiomers in plasma. After liquid-liquid extraction with dichloromethane, the enantiomers were resolved on the CHIRALPAK AD[®] column using hexane-ethanol (88:12) plus 0.1 % diethylamine as the mobile phase and monitored at 315 nm. The extraction procedure resulted in absolute recoveries of 62.9% and 61.3% for (R)- and (S)-PPF, respectively, and of 57.6% and 56.5% for (R)- and (S)-PPF-5OH, respectively. The method allows the determination of PPF and PPF-5OH enantiomers at the

Introdução

1.1 Quiralidade

Em 1848, na Escola Normal Superior de Paris, o químico Luís Pasteur fez uma série de observações que o levaram, alguns anos mais tarde, a enunciar um princípio que constitui a base da estereoquímica. Pasteur, nessa altura ainda bastante jovem, havia retomado do Colégio Real de Besançon (onde concluíra seu bacharelado em Ciências com a classificação de medíocre em Química) e acabara precisamente de conquistar o seu título de doutor em Ciências na Universidade Parisiense (KAUFFMAN & MYERS, 1975; MORRISON & BOYD, 1990).

Para se familiarizar com a cristalografia, repetia um trabalho que outro químico havia realizado sobre os sais do ácido tartárico, quando notou alguma coisa em que ninguém havia reparado antes: o tartarato de sódio e amônio opticamente inativo consistia numa mistura de duas espécies diferentes de cristais, que eram a imagem uma da outra num espelho plano. Com o auxílio de uma lupa e de uma pinça, Pasteur conseguiu separar cuidadosa e laboriosamente a mistura em dois pequenos montículos - um de cristais direitos e outro de cristais esquerdos - do mesmo modo que se poderiam separar luvas direitas e esquerdas abandonadas a esmo sobre o balcão de uma loja (MORRISON & BOYD, 1990; ROMERO, 1998).

Para sua surpresa, ainda que a mistura original fosse opticamente inativa, cada grupo de cristais dissolvido em água, resultava numa solução opticamente ativa. Além disso, as rotações específicas das duas soluções eram exatamente iguais, mas de sinal contrário, ou seja, uma solução desviava o plano de luz polarizada para a direita e a outra girava-o o mesmo

número de graus, para a esquerda. Todas as outras propriedades físicas da substância eram idênticas (MORRISON & BOYD, 1990; ROMERO, 1998).

Visto que a diferença de rotação óptica era observada em solução, Pasteur concluiu que ela era característica não dos cristais, mas das moléculas. Enunciou, então, a hipótese de que as moléculas que constituíam os cristais, tal como os cristais dos dois grupos, eram imagens umas das outras num espelho plano. Isto correspondia a suposição da existência de isômeros (enantiômeros), cujas estruturas diferiam uma da outra apenas em uma ser a imagem da outra num espelho plano e cujas propriedades físicas diferiam apenas no sentido de rotação do plano de luz polarizada. Em 1964, Cahn, Ingold e Prelog propuseram que fossem empregados os termos quiral e quiralidade, baseadas na palavra derivada do grego "cheir" (mãos), para designar pares de imagens especulares não sobreponíveis. (KAUFFMAN & MYERS, 1975; MORRISON & BOYD, 1990).

A luz polarizada planar (luz que vibra em somente um plano) que passa através da solução contendo um dos enantiômeros de uma substância quiral, emerge vibrando em um plano diferente. O enantiômero que gira o plano de luz polarizada no sentido horário (para direita), como veria o observador, é dextro-rotatório; o enantiômero que o gira para a esquerda é levo-rotatório. Os símbolos (+) e (-) designam a rotação para a direita e para a esquerda, respectivamente. Devido a esta atividade óptica, os enantiômeros são chamados isômeros ópticos. A forma racêmica (+/-) é opticamente inativa porque não desvia o plano de luz polarizada. A rotação específica é uma propriedade física inerente ao enantiômero, mas varia de acordo com a concentração, o solvente empregado, a temperatura e o

comprimento de onda da luz usada (ROMERO, 1998; MORRISON & BOYD, 1990). Somente no final do século XVIII, estaria reservado a Van't Hoff e Le Bel revelar que um átomo de carbono tetraédrico explicaria não só a ausência de isômeros ópticos nos compostos de fórmula CH_3Y e CH_2YZ , mas também a existência de isômeros que são a imagem um do outro no espelho plano (enantiômeros), como os ácidos tartáricos estudados por Pasteur. Posteriormente, descobriu-se que os dois enantiômeros têm propriedades químicas também idênticas, excetuando-se apenas as reações e/ou interações com outros compostos opticamente ativos (MORRISON & BOYD, 1990). Atualmente, define-se estereoisômeros como moléculas que possuem a mesma fórmula estrutural, mas que diferem na orientação espacial dos átomos. Uma forma especial de estereoisomerismo ocorre quando um átomo individual, usualmente carbono, possui quatro substituintes distintos, sendo chamado de carbono assimétrico e constituindo um centro quiral (FIGURA 1). Nesse caso, ocorrem duas espécies denominadas enantiômeros, que são imagens especulares não sobreponíveis.

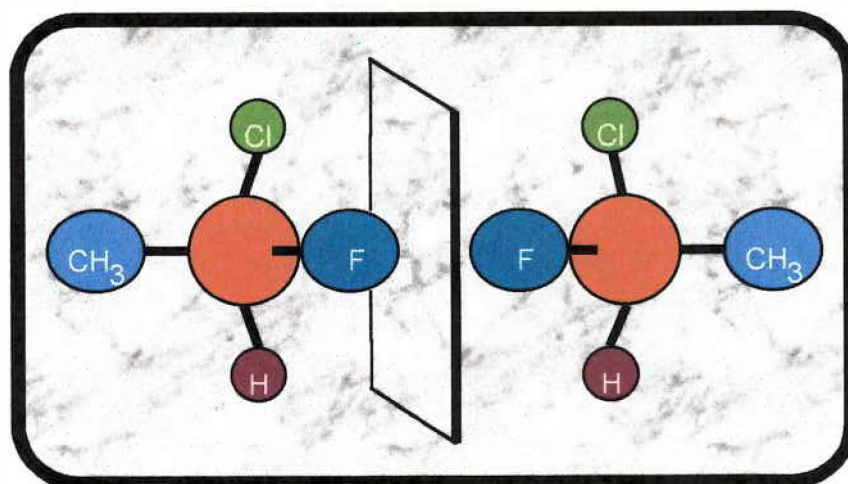


FIGURA 1 Enantiômeros na sua forma mais comum, carbono assimétrico

Esses enantiômeros são denominados "S" (do latim *sinister* ou esquerdo) ou "R" (do latim *rectus* ou direito), de acordo com a configuração e (+) e (-), em função da habilidade de girar o plano de luz polarizada para direita ou para a esquerda, respectivamente.

1.2 Fármacos Quirais

Um grande número de agentes terapêuticos de origem sintética ou natural exibem a propriedade da quiralidade. Esse número tem aumentado significativamente nos últimos 20 anos, sendo que cerca de 40 % dos fármacos obtidos por vias sintéticas são compostos quirais, na maioria (88%) comercializados e usados como racematos. Isto ocorre porque procedimentos sintéticos estereoespecíficos não são disponíveis para todos os fármacos quirais ou, se disponíveis, envolvem processos de custo elevado (MARZO, 1993).

Entretanto, quando fármacos quirais administrados como racematos são introduzidos no ambiente quiral dos sistemas biológicos, surgem diferenças na disposição dinâmica e cinética dos enantiômeros, já que receptores e enzimas interagem seletivamente às diferenças configuracionais (HYNECK *et al.*, 1990).

As propriedades farmacodinâmicas de um composto estão relacionadas ao efeito terapêutico ou tóxico, enquanto as propriedades farmacocinéticas dizem respeito à absorção, distribuição, metabolização e eliminação do fármaco no organismo (RODEN, 1994). Exemplos de fármacos quirais cujos enantiômeros têm diferentes ações farmacológicas são numerosos. O caso da talidomida talvez seja o exemplo mais conhecido,

principalmente devido às trágicas circunstâncias que envolveram esse fármaco nos anos 60, devido a sua ação sedativa e suas propriedades relacionadas ao sono. A talidomida foi comercializada como racemato, contudo, descobertas posteriores apontaram-na como causadora de terríveis efeitos colaterais na forma de séria malformação fetal, em mulheres que a usaram durante a gravidez (De CAMP, 1989). Mais tarde, foi observado que apenas a forma (S) do fármaco possui o efeito teratogênico mas que existe a possibilidade de racemização quando é administrado apenas o enantiômero (R) (Knoche & Blaschke, *apud* ELIEL, 1997).

É comum a existência de fármacos que apresentam a mesma atividade biológica, mas com potências diferentes para cada enantiômero. No caso do propranolol, o isômero (S) é cem vezes mais potente que o isômero (R). A prometazina é um exemplo raro de um fármaco que apresenta a mesma atividade biológica e potência para ambos enantiômeros, no que concerne à sua atividade anti-histamínica (HYNECK *et al.*, 1990).

As propriedades farmacocinéticas também são freqüentemente estereosseletivas. O metotrexato é um fármaco quiral empregado como racemato na terapia anti-câncer. A forma (R) do metotrexato é ativamente transportada através da membrana do trato gastrointestinal, de maneira que sua absorção é cerca de 40 vezes maior que do enantiômero (S). A dihidroxifenilalanina leva a um aumento dos níveis de dopamina em pacientes que sofrem do mal de Parkinson. A descarboxilação da dihidroxifenilalanina é um bom exemplo de metabolização estereosseletiva, pois a descarboxilase que promove esta reação só reconhece o isômero (S). Isto leva a uma

predominância do isômero (R) no plasma, este isômero é responsável por efeitos colaterais como granulocitopenia (Albert *apud* CAMILLERI, 1991).

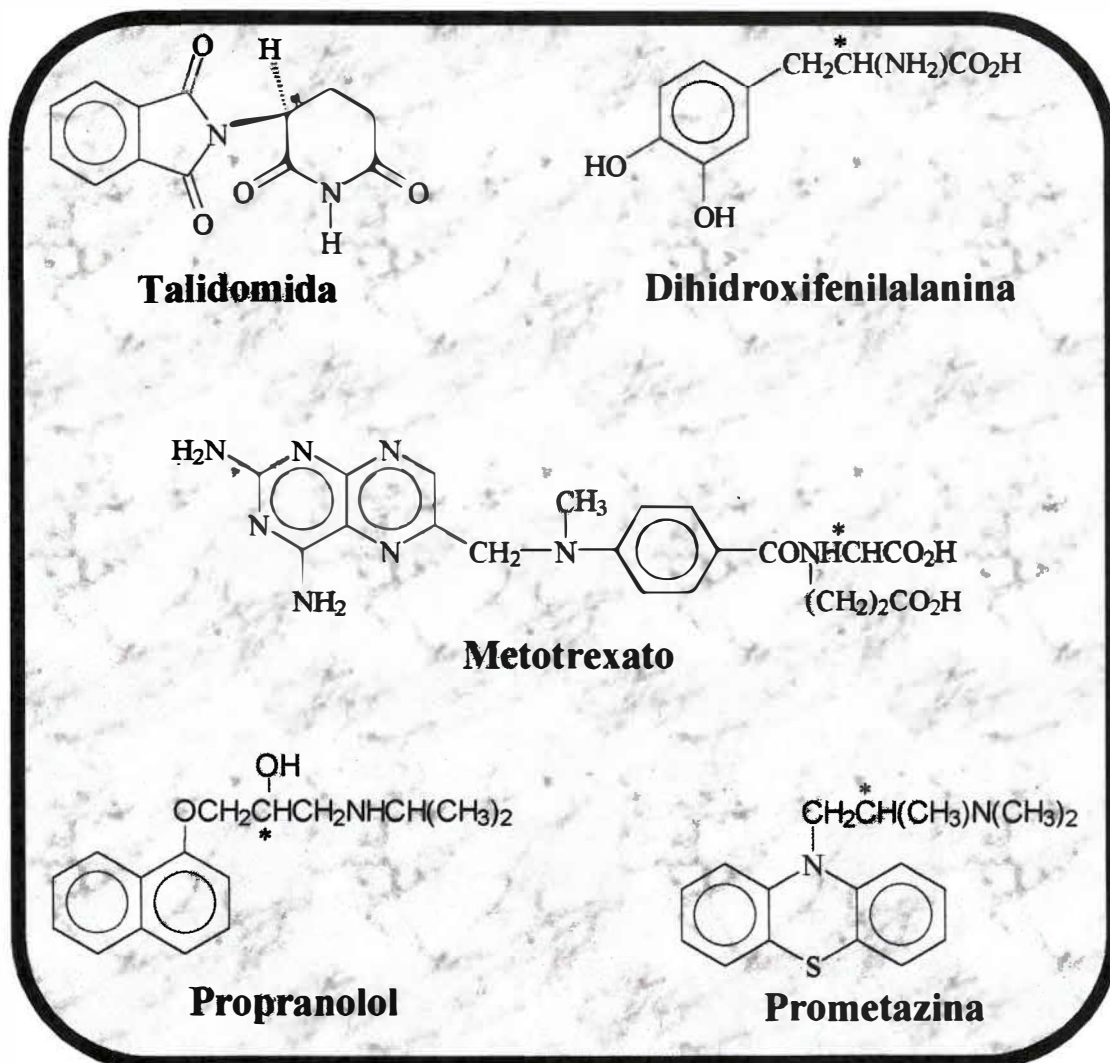


FIGURA 2 Exemplos de fármacos quirais

O conhecimento de que grande parte dos fármacos de origem natural existe na forma opticamente ativa e o fato de estudos realizados nas últimas décadas demonstrarem que existem diferenças nas atividades biológicas entre pares de enantiômeros, levaram à conscientização da necessidade de produção dos fármacos sintéticos em suas formas enantiomericamente puras ou que, pelo menos, as propriedades farmacológicas dos enantiômeros

isolados sejam determinadas antes da comercialização do racemato (De CAMP, 1989; LENNARD, 1991).

Para estudar essas diferenças de comportamento das formas enantioméricas é essencial a disponibilidade de técnicas analíticas de discriminação quiral.

1.3 Separação de Enantiômeros

Dentre as várias técnicas cromatográficas empregadas para a resolução de enantiômeros destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em princípio, a separação de enantiômeros pode ser realizada por procedimentos diretos ou indiretos, mas é sempre necessário usar alguma espécie de discriminador ou seletor quiral (DÄPPEN *et al.*, 1986; MARTINS *et al.*, 1991).

1.3.1 Procedimentos Indiretos de Separação

Nos métodos indiretos de separação, primeiramente os enantiômeros formam derivados através da reação com reagentes quirais opticamente puros. Isto leva à formação de diastereoisômeros através de ligações covalentes entre o soluto e o reagente quiral opticamente puro, que possuem propriedades físicas e químicas diferentes, podendo ser separados por métodos físicos ou por métodos cromatográficos normais (CAMILLERI, 1991).

A desvantagem deste procedimento é que ele é trabalhoso, lento e requer o uso do reagente de derivação enantiomericamente puro, portanto, de custo elevado, podendo também haver racemização durante a formação dos diastereoisômeros ou durante o armazenamento. No caso da utilização de reagentes contaminados, pode-se obter resultados falsos. Outra fonte de erros se deve a cinética das reações, já que a velocidade de reação dos enantiômeros com outra substância opticamente ativa pode ser diferente, resultando na formação de diastereoisômeros em proporções diferentes daquelas presentes na mistura racêmica original (SANTORO, 1992; SRINIVAS & IGWEMEZIE, 1992; MARTINS *et al.*, 1991).

1.3.2 Procedimentos Diretos de Separação

O principal procedimento direto de separação enantiosseletiva envolve o uso de fases estacionárias quirais que formam complexos diastereoisoméricos transitórios com os enantiômeros de solutos quirais. A diferença de estabilidade entre os complexos formados determina a diferença nos tempos de retenção, sendo responsável pela separação (TOPIOL, 1989; MARTINS *et al.*, 1991; CAMILLERI, 1991; LINDNER 1991).

Dentre as principais vantagens desse procedimento de resolução quiral destaca-se o grande número de colunas quirais disponíveis comercialmente, a maior facilidade de recuperação dos enantiômeros e a velocidade da análise. Porém, a maior dificuldade no entendimento do mecanismo de separação e o alto custo das fases estacionárias quirais constituem as

maiores desvantagens para aplicação desta técnica (SANTORO, 1992; DÄPPEN *et al.*, 1986; SRINIVAS & IGWEMEZIE, 1992).

Um outro procedimento consiste em adicionar aditivos quirais à fase móvel. Esse procedimento requer uma grande quantidade de aditivo, o que não é vantajoso pois o reagente enantiomericamente puro é, geralmente, muito caro. Outra desvantagem é a complexidade normalmente encontrada no desenvolvimento do método (MARTINS *et al.*, 1991, CAMILLERI, 1991; SANTORO, 1992; DÄPPEN *et al.*, 1986).

Por estas razões, têm sido grande os avanços no desenvolvimento de fases estacionárias quirais para uso em CLAE. Assim sendo, esta foi a técnica adotada para a realização deste estudo.

1.4 Fases Estacionárias Quirais

1.4.1 Mecanismos de Discriminação Quiral

Inúmeras teorias têm sido desenvolvidas na tentativa de elucidar o mecanismo de discriminação quiral que atua nas diferentes fases estacionárias.

Considerando um composto quiral como sendo compreendido por duas moléculas (R) e (S) que diferem entre si somente no arranjo intramolecular de seus átomos, que são experimentalmente indistinguíveis (a não ser pelo fato de desviarem diferentemente a luz polarizada) e que possuem o mesmo calor de formação e as mesmas propriedades físico-

químicas, é difícil imaginar que suas reatividades características possam ser diferentes. Entretanto, isso pode ocorrer com esta mistura quando se utiliza um reagente quiral, que por possuir esta propriedade é também chamado de seletor quiral (LINDNER, 1991).

Quando os enantiômeros eluem através de fases estacionárias quirais (FEQ), cada um forma com esta fase um complexo transitório. Estes complexos são diastereoisômeros porém, para que a separação dos enantiômeros seja obtida, a energia de formação dos diastereoisômeros transitórios não deve ser a mesma (LINDNER 1991).

Um dos primeiros modelos para explicar a resolução de enantiômeros foi proposto por DALGLIESH (1951). De acordo com este autor, para que ocorra a resolução dos enantiômeros são necessários pelo menos três forças de interação (Teoria dos três pontos), sendo que uma deve ser de natureza estereoespecífica, podendo ser repulsiva ou atrativa (TOPIOL, 1989; DALGLIESH, 1951). Duas moléculas interagem entre si quando começam a perturbar a energia eletrônica orbital uma da outra, isto é, seus orbitais começam a se entrelaçar apreciavelmente. Interações do tipo pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo e estéricas, são capazes de causar essas perturbações e fazem parte das teorias que explicam o reconhecimento quiral (LINDNER, 1991).

Num modelo clássico como o mostrado na **FIGURA 3**, são necessárias três forças intermoleculares simultâneas de atração, repulsão e efeitos estéreos para criar habilidades de reconhecimento quiral intermolecular por formação de associados diastereoisoméricos (LINDNER, 1991).

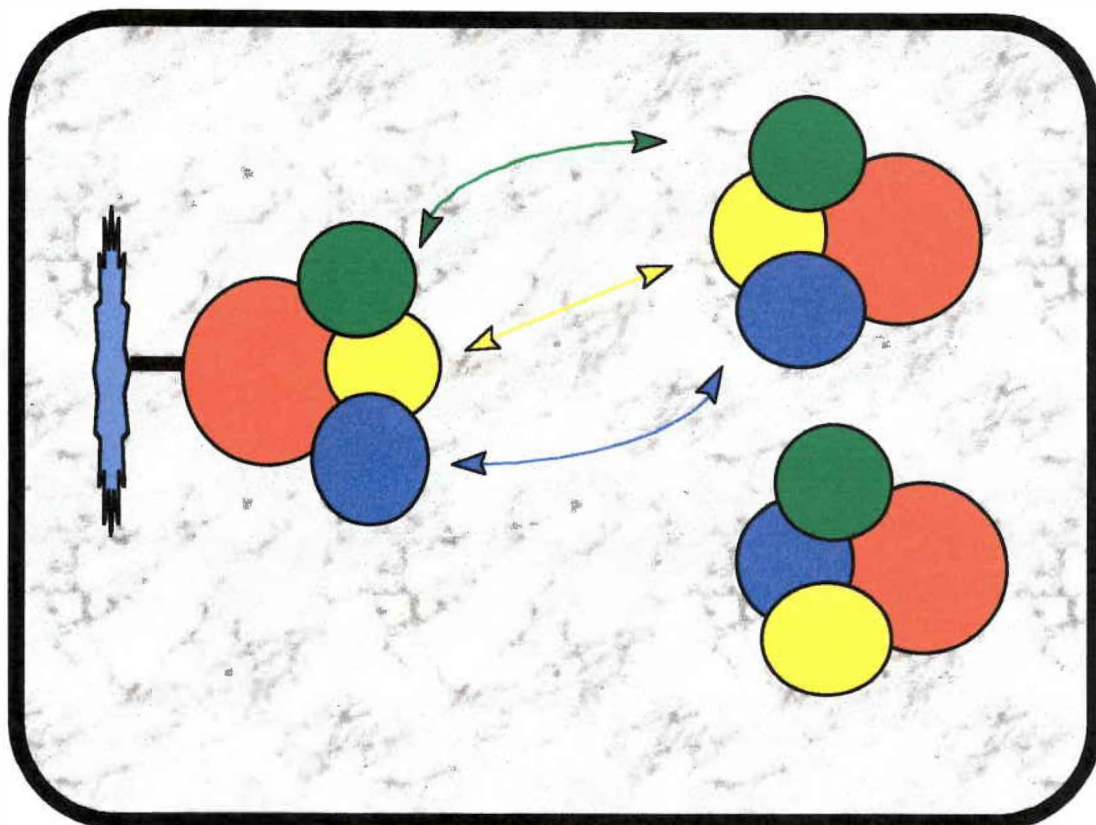


FIGURA 3 Modelo clássico de interação enantiosseletiva em três pontos de contato

A regra dos três pontos assume que, para ocorrer a separação, somente um dos enantiômeros do par conseguirá interagir simultaneamente com os três pontos do seletor quiral requisitados. Infelizmente, esse modelo não é aplicável a todas moléculas quirais.

Recentemente, TOPIOL (1989) sugeriu a denominação de pontos de contato no lugar de pontos de interação, visto que estes podem ser atrativos ou repulsivos e demonstrou, utilizando conceitos de simetria e análise computacional, que mecanismos baseados em um ou dois pontos de contato são também possíveis e podem levar ao reconhecimento quiral.

1.4.2 Tipos de Fases Estacionárias Quirais

As fases estacionárias quirais comercialmente disponíveis usam diferentes princípios de separação e podem ser reunidas segundo a seguinte classificação (GÜBITZ, 1990; DÁPPEN, 1986).

- Fases baseadas em polímeros helicoidais
- Fases com cavidades quirais.
- Fases quimicamente ligadas.
- Fases por troca de ligante.
- Fases protéicas.

- Fases Baseadas em Polímeros Helicoidais

A cromatografia quiral com polímeros helicoidais baseia-se no fato de polímeros com uma estrutura helicoidal serem hábeis para separar enantiômeros por efeitos estéreo. Os enantiômeros são diferentemente retidos se houver diferença nas interações com as camadas das hélices (YASHIMA & OKAMOTO 1995; GÜBITZ, 1990).

Dentre as fases estacionárias utilizadas neste tipo de cromatografia destacam-se os derivados da celulose. Embora a celulose "*in natura*" possa ser usada para a separação de enantiômeros por CLAE, resultados mais apropriados têm sido obtidos com seus derivados (OKAMOTO *et al.*, 1986).

Derivados de Celulose

As primeiras tentativas na separação cromatográfica de enantiômeros focalizaram-se quase que exclusivamente no uso de adsorventes quirais naturais, tais como celulose ou dextrano.

A celulose consiste de resíduos de um açúcar cíclico (glicose) conectados através de ligações glicosídicas, apresentando uma estrutura helicoidal conformacionalmente estável (SHIBATA *et al.*, 1989). Contudo, as camadas desse polímero helicoidal são muito densas, tornando difícil a penetração de moléculas e, portanto, a celulose em seu estado original apresenta enantiosseletividade limitada.

A pressão máxima na operação de colunas preparadas com essas fases é da ordem de 80 bar e há várias restrições com relação às fases móveis empregadas, devido à contração e inchaço do recheio, que levam a uma redução na eficiência da coluna (OKAMOTO & KAIDA, 1994).

Tentativas no sentido de melhorar as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas da celulose concentraram-se na obtenção de seus derivados. Estas modificações foram efetuadas no sentido de diminuir a polaridade da celulose e aumentar a massa de matéria estérea para maior interação entre a FEQ e o soluto (DÄPPEN *et al.*, 1986; GÜBITZ, 1990; YASHIMA & OKAMOTO, 1995). A derivação dos grupos OH da celulose não destrói a estrutura helicoidal do polímero e forma uma estrutura terciária, onde são criadas cavidades capazes de interagir enantiosseletivamente com várias moléculas quirais (OKAMOTO *et al.*, 1986).

Em 1976, Hesse & Hagel introduziram a celulose triacetato, preparada por acetilação da celulose microcristalina sob diferentes condições. Outras inovações com relação aos derivados de celulose empregados como FEQ foram introduzidas pelo grupo de Okamoto e incluem a preparação de carbamatos obtidos pelo tratamento da celulose com arilisocianatos e a incorporação desses derivados em partículas de sílica. Dentre essas fases

destaca-se a celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) incorporada em sílica gel com partícula de 10 ou 5 μm , comercializada pela Daicel como CHIRALCEL OD[®] e CHIRALCEL OD-H[®], respectivamente (Hesse & Hagel *apud* SANTORO, 1992).

Recentemente, muitas fases estacionárias quirais baseadas em derivados de celulose (ésteres, éteres e carbamatos) têm sido desenvolvidas pelo grupo de OKAMOTO (OKAMOTO *et al.*, 1986; OKAMOTO & KAIDA, 1994). A FIGURA 4 mostra a estrutura de algumas dessas fases.

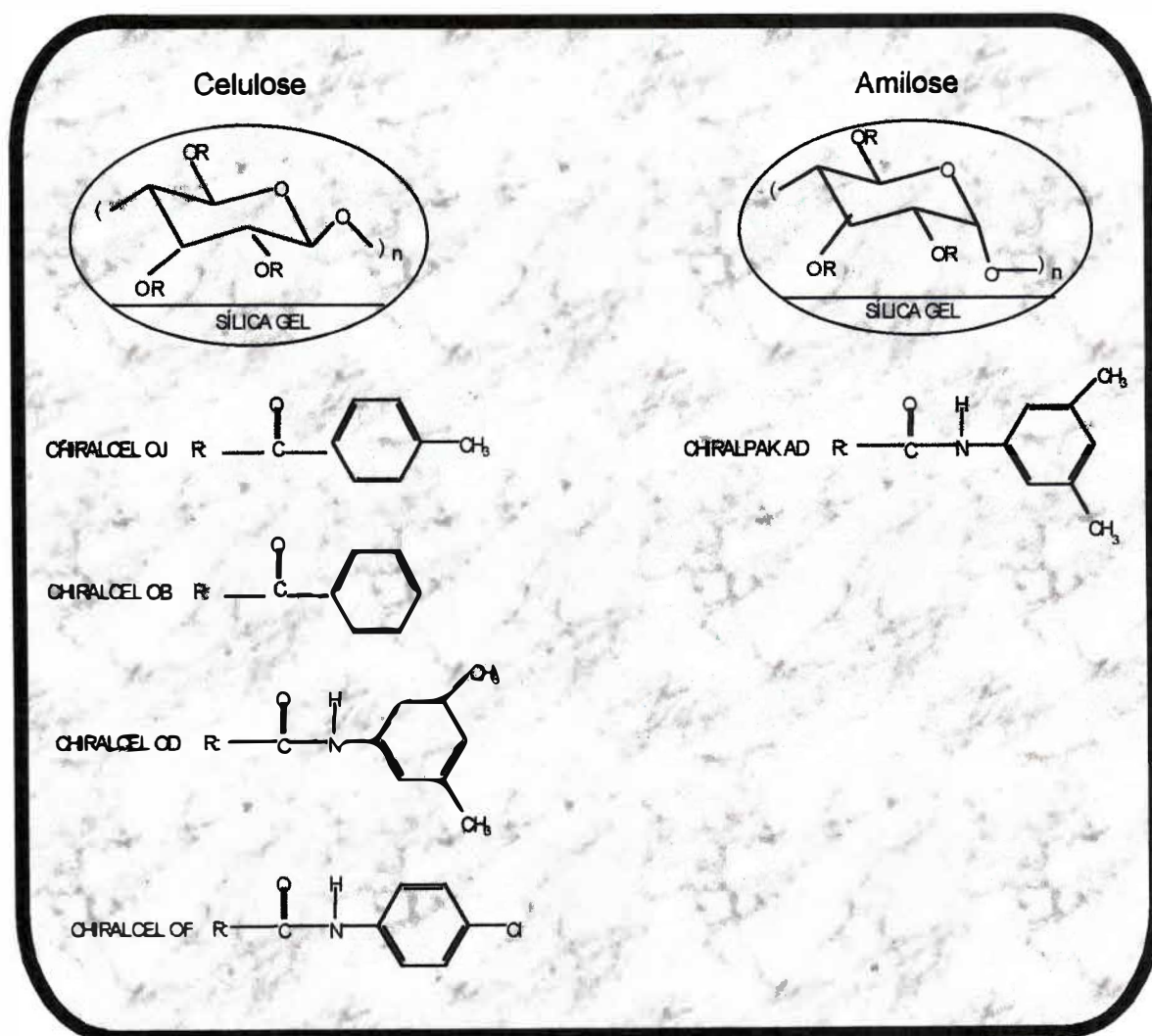


FIGURA 4 Algumas fases estacionárias quirais baseadas em derivados de celulose e amilose

Estes derivados podem ser utilizados para a separação enantiomérica de um grande número de fármacos (TABELA 1). Tanto solventes polares (metanol, etanol) quanto apolares (hexano, 2-propanol) podem ser utilizados na composição das fases móveis empregadas nessas colunas.

O soluto sempre compete com o modificador pelo sítios capazes de formar pontes de hidrogênio na fase estacionária quiral. Esta competição ocorre em sítios quirais e não quirais da fase estacionária (TANG, 1996).

Os aditivos orgânicos dietilamina e ácido trifluoroacético também podem ser utilizados para otimização da análise, pois proporcionam uma melhora na separação e simetria dos picos. O efeito da adição de ácidos ou bases à fase móvel está relacionado a sua capacidade de formar pontes de hidrogênio com os grupos silanóis residuais da fase estacionária, impedindo assim que o soluto possa ser afetado por estes sítios e otimizando a separação (TANG, 1996).

No caso do emprego de ácido trifluoroacético, uma outra possibilidade é a formação de pares iônicos entre o soluto e o aditivo, o que levaria a uma redução na retenção (TANG, 1996).

Derivados de Amilose.

A coluna CHIRALPAK AD[®] é um derivado tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) da amilose. Como foi mostrado na FIGURA 3, a celulose e a amilose são polímeros formados por resíduos de açúcares cíclicos conformacionalmente estáveis, conectados através de ligações glicosídicas (β na celulose e α na amilose). A estrutura secundária dos polissacarídeos e de seus derivados em solução, até o presente momento, não estão completamente esclarecidas.

TABELA 1 Alguns compostos resolvidos nas colunas baseadas em derivados de celulose (GÜBITZ, 1990; LEDERER 1986)

Seletor Quiral	Coluna Quiral	Substância
Celulose triacetato	CHIRALCEL OA®	Acetamina Oxindazac Barbitúricos Oxapadol Mianserina Praziquantel Rolipram Metaqualona β-bloqueadores Etazolin Temazepam
Celulose tribenzoato	CHIRALCEL OB®	Barbitúricos Inseticidas Organofosforados
Celulose tris(p-metilbenzoato)	CHIRALCEL OJ®	Clofedanol Hidroxizina Sulconazol Triadimefona Clormezanona Metaqualona Fenitoína Metosuccimida
Celulose tris(fenilcarbamato)	CHIRALCEL OC®	Warfarina Oxazepam Oltran Flubiprofeno
Celulose tris(3,5-dimetilfenil carbamato)	CHIRALCEL OD®	β-bloqueadores Perisoxal Carbinoxamina Atropina Homatropina Ifosfamida β-adrenérgicos Primaquina Warfarina Anti-hipertensivos Anti-histamínicos Fenotiazidas Disopiramida Sulpirida Anti-inflamatórios Betaxolol Glutatimida Oxazepam Mianserina Fenoprofen Flubiprofen Timebutina Cloxazolam Tioridazina
Celulose tricinamato	CHIRALCEL OK®	Barbitúricos Glutatimida Naproxeno
Celulose tris(p-metilfenilcarbamato)	CHIRALCEL OG®	Diltiazem
Celulose tris(p-cloro-fenilcarbamato)	CHIRALCEL OF®	Disopiramida Etiazida Oxazolam Nicardipina Acetilfenitolida Perisoxal

As estruturas mais aceitas e defendidas mostram uma conformação helicoidal da cadeia (BARGMAN-LEYDER *et al.*, 1995).

Recentemente, YASHIMA & OKAMOTO propuseram que as possíveis estruturas poderiam ser uma cadeia de conformação helicoidal 3/2 para celulose tris(fenilcarbamato) e uma cadeia de conformação helicoidal 4/1 para amilose tris(fenilcarbamato). Foi também postulado que esta diferença nas estruturas desses dois polímeros seriam responsáveis pelas diferentes propriedades cromatográficas exibidas pelas fases estacionárias quirais constituídas por celulose e amilose modificadas (YASHIMA & OKAMOTO, 1995).

Estas observações indicam que a conformação da cadeia helicoidal das fases estacionárias quirais constituídas por derivados de celulose é mais rígida que a constituída por derivados de amilose. Isto pode explicar, em parte, as diferentes habilidades exibidas por estas fases quirais. Contudo, é muito difícil associar o mecanismo dessas variações de seletividade em relação a estrutura do soluto (BARGMAN-LEYDER *et al.*, 1995; YASHIMA & OKAMOTO, 1995).

-Fases contendo cavidades quirais

Ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CD) são moléculas cíclicas de oligoglucose que contém de 6 a 12 unidades de glicose unidas através de ligações α -(1,4). As CD podem ser classificadas como α , β , ou γ -CD de acordo com o número de unidades de glicose, seis, sete e oito, respectivamente. As CDs formam um tubo com ambos os lados abertos; em uma abertura estão situados os grupos 2-hidroxi das unidades de glicose. O interior da cavidade não possui grupos

2-hidroxi, apresentando características hidrofóbicas (Armstrong *apud* GÜBITZ, 1990).

A propriedade de reconhecimento quiral das CDs está baseada na inclusão de um grupo aromático na cavidade hidrofóbica (FIGURA 5). O centro quiral do analito deve estar próximo a entrada da cavidade, para ocorrer a formação de pontes de hidrogênio entre o soluto e os grupo OH nos carbonos C-2 e C-3, localizados na borda da CD (DÄPPEN *et al.*, 1986; MARTINS *et al.*, 1991; HAN & ARMSTRONG, 1989; GÜBITZ, 1990).

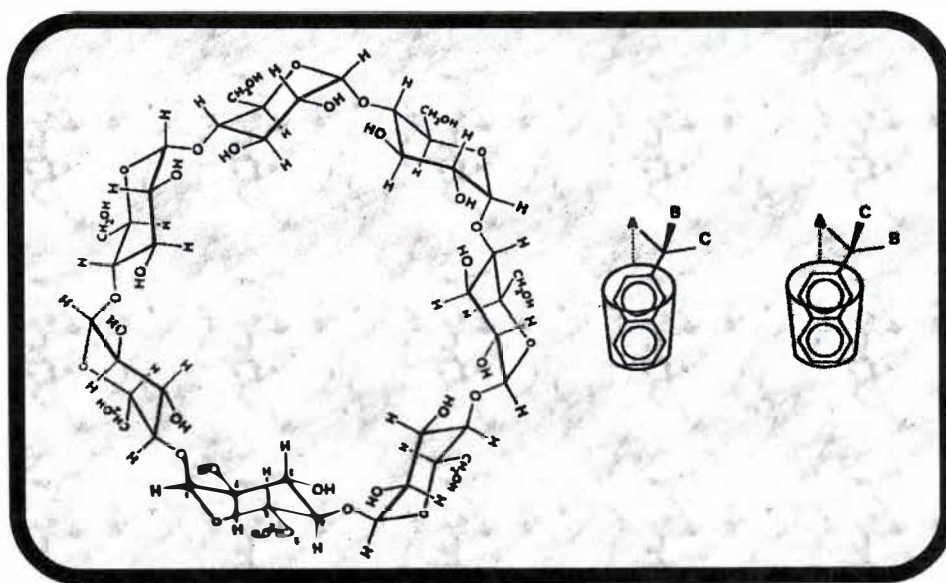


FIGURA 5 Mecanismo de inclusão nas CDs

Muitos fatores estruturais que afetam o reconhecimento quiral das CDs foram discutidos detalhadamente por HAN & ARMSTRONG (1989), responsáveis também pelo desenvolvimento da primeira coluna para CLAE baseada em CDs. Fases deste tipo estão disponíveis comercialmente e são empregadas para a resolução de um grande número de fármacos (TABELA 2) (GÜBITZ, 1990).

TABELA 2 Alguns compostos resolvidos nas colunas baseadas em CDS (GÜBITZ, 1990)

Seletor Quiral	Substância
Ciclodextrinas	Propranolol Metoprolol Barbitúricos Hidantoína Clorfeniramina Nisoldipina Nimodipina Fensuccimida Clortalidona Metadona Metilfenidato Alcalóides da Chinchona Tamoxifeno Clomifeno Nomifesina Atropina Escopolamina Cocaína Oxazepam Terbutalina Norgestrel

Também foram desenvolvidas fases baseadas em uma mistura de derivados carbamatos da β -CD, imobilizados em sílica contendo grupos dióis. A seletividade desta fase foi demonstrada utilizando-se hexobarbital e clorfeniramina. CDs alquiladas e acetiladas também têm sido utilizadas em CLAE, cromatografia em camada delgada e mais recentemente em cromatografia gasosa (Haginaka & Wakai *apud* GÜBITZ, 1990).

-Fases Quimicamente Ligadas

A preparação de fases quirais baseadas na formação de ligações múltiplas é possível pelo fato dos grupos silanóis da superfície da sílica serem susceptíveis à derivação química. Vários grupos contendo centros de assimetria têm sido ligados à sílica, gerando fases estacionárias com características distintas, úteis para a resolução de uma grande variedade de compostos aromáticos neutros e apolares (DÄPPEN *et al.*, 1986).

Fases quirais quimicamente ligadas foram introduzidas por Mikes *et al.*, para a separação de helicenos racêmicos. Posteriormente, os grupos de Pirkle e Ôi sintetizaram um grande número de fases quimicamente ligadas, algumas delas comercialmente disponíveis. Dentre essas fases destaca-se a fase receptora de elétrons π , (R)-N-(3,5-dinitrobenzil) fenilglicina ((R)-N-DNBFG), também chamada "Fase Pirkle". O modelo de reconhecimento quiral, proposto por Pirkle, está baseado nas interações π - π , dipolo-dipolo e pontes de hidrogênio, como ilustra a FIGURA 6 (Mikes *apud* GÜBITZ, 1990; PIRKLE *et al.*, 1980).

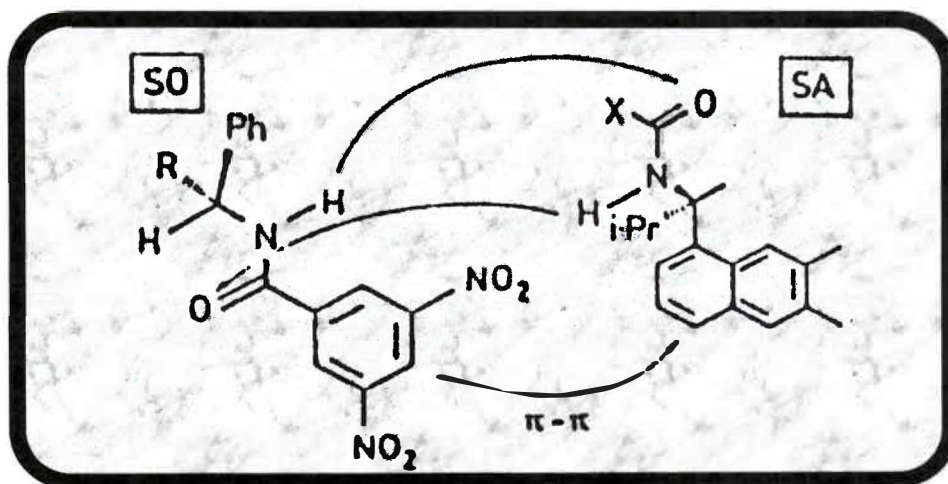


FIGURA 6 Interações tipo PIRKLE

Algumas substâncias que possuem grupos doadores de elétrons π podem ser diretamente resolvidas por fases desse tipo. Porém, na maioria dos casos, torna-se necessária a introdução de grupos doadores de elétrons por derivação (TABELA 3).

PIRKLE *et al.* (1981) também desenvolveram fases com grupos doadores de elétrons π . Estas fases mostraram uma marcante seletividade para derivados de aminas 3,5-dinitrobenzil, aminoácidos, di- e tri-peptídeos.

TABELA 3 Alguns compostos resolvidos utilizando fases quirais do tipo π -doador e π -receptor (GÜBITZ, 1990)

Substância	Derivado	Fase
β -adrenérgicos	Ariloxazolidinas	(R)-N-DNBPG
Efedrina	Ariloxazolidinas	(R)-N-DNBPG
Norefedrina	Oxazolidinodionas	(R)-N-DNBPG
β -adrenérgicos	Oxazolidinodionas	2-amino-2-desoxiglicose-quinina
Análogos a Efedrina	N(3,5-dinitrobenzil)	Quinina
Análogos a Norefedrina	Naftilarilcarbamatos	(R)-N-DNBPG
Anfetamina	3,5-dinitrofenil	(S)-N-(2-naftil)valina
Anfetamina	N-1-Naftil	(R)-N-DNBPG
Anfetamina	N-1-Naftil	(R)-N-DNBPG
β -adrenérgicos	Naftiluréias	(R)-N-DNBPG
β -bloqueadores	Naftiluréias	(R)-N-DNBPG
β -bloqueadores	Feniluretanos	2-amino-2-desoxiglicose
β -bloqueadores	Oxazolidinodionas	2-amino-2-desoxiglicose
β -bloqueadores	Oxazolidinodionas	(S,S)-DACH-DNB
Propranolol	Oxazolidinodionas	(R)-N-DNBPG
Barbitúricos	-	(R)-N-DNBPG
Glutarimidas	-	(R)-N-DNBPG
Succinimidas	-	(R)-N-DNBPG
Glutatimida	-	(R)-N-DNBPG
Benzodiazepinonas	-	(R)-N-DNBPG
Anti-inflamatórios	Naftalenometilamidas	(R)-N-DNBPG
Anti-inflamatórios	4-metoxianilidas	(R)-N-DNBPG
Primaquina	-	(R)-N-DNBPG
Fenotiazidas	-	(R)-N-2-fenileteíl-N-propiluréia
Albendazolsulfóxido	-	(S)-N-DNBT
Piretróides	-	(S)-N-DNBPG
Piretróides	-	N-(S)-1-(naftil)etilaminocarbonil-L-valina
Ácido Pantotênico	3,5-dinitrobenzil	D-naftiletilamina

-Fases por Troca de Ligante

A cromatografia por troca de ligante foi introduzida através de um experimento onde os autores relataram a resolução dos enantiômeros de aminoácidos empregando fases preparadas com poliestireno clorometilado e aminoácidos. Atualmente, as fases estacionárias desse tipo são preparadas a partir da ligação de aminoácidos, por exemplo L-prolina e L-valina, à partículas de sílica, via 3-glicidoxipropil. Após tratamento com solução aquosa de sulfato de cobre, as fases estão prontas para formação de complexos enantiosseletivos com moléculas contendo dois grupos funcionais

polares, como por exemplo, β -amino álcoois e aminoácidos (SANTORO, 1992; CAMILLERI, 1991; DÄPPEN *et al.*, 1986).

Estas fases mostraram uma elevada seletividade para aminoácidos não derivados, α -alquil e N-alquil aminoácidos, alguns aminoácidos derivados, dipeptídeos e hidroxí-ácidos. Exemplos de compostos de interesse farmacêutico resolvidos nestas fases são DOPA, α -metil-DOPA e hormônios tireoidanos (**TABELA 4**) (GÜBITZ, 1990).

TABELA 4 Alguns compostos resolvidos nas fases por troca de ligante (GÜBITZ, 1990)

Tipo de Fase	Substância
Troca de Ligante	DOPA α -metil-DOPA Barbitúricos Hormônios Tireoidanos Adrenalina Noradrenalina Bupranolol Norefedrina Norpseudoefedrina p-hidroxinorefedrina Nordefrin Metoxamina Octopamina Norfenilefrina Orciprenalina Primenol

-Fases Protéicas

As fases protéicas utilizam as propriedades estereosseletivas das proteínas para possibilitar a resolução de enantiômeros. A técnica foi primeiramente desenvolvida através da utilização de uma coluna de soroalbumina bovina (BSA) ligada à agarose para resolução dos enantiômeros do triptofano. Posteriormente, ALLENMARK (1989), desenvolveram procedimentos para ligação de BSA à sílica, enquanto que

HERMANSSON (1984) propôs fases preparadas a partir da ligação de α_1 -glicoproteína ácida (α_1 -AGP) à sílica. Mais recentemente, a proteína ovomucóide de ovo de galinha foi imobilizada em partículas de sílica (PINKERTON *et al.*, 1995).

O mecanismo de separação em colunas preparadas com fases protéicas é desconhecido, embora não haja dúvidas de que esteja baseado em princípios de bioafinidade, incluindo interações hidrofóbicas, interações entre grupos polares e efeitos estéreos. O pH, força iônica, concentração do modificador orgânico e temperatura são parâmetros importantes de discriminação quiral (PINKERTON *et al.*, 1995).

As fases protéicas exibem a mais ampla faixa de seletividade de todas as fases estacionárias quirais. Presume-se que este fato se deva às múltiplas interações intermoleculares ao longo da superfície da proteína, mas o mecanismo exato de separação quiral continua desconhecido (KIRKLAND *et al.*, 1991). Outras vantagens são a habilidade de se obter o reconhecimento quiral pelo método direto, sem a necessidade de pré-derivação da amostra e o uso de fases móveis aquoso/orgânicas (ALLENMARK & ANDERSSON, 1994).

Entre as desvantagens dessas colunas encontram-se a baixa capacidade, a baixa eficiência e o mecanismo de enantiosseletividade pouco conhecido. Além disso, a proteína em si não é durável, sendo sujeita a degradação com o tempo de uso, temperatura e pH. Finalmente, a predição racional da ordem de eluição é difícil, em função dos vários sítios de interação presentes na proteína (ALLENMARK & ANDERSSON, 1994).

Coluna ULTRON ES-OVM

A proteína ovomucóide exibe qualidades especialmente úteis para distinguir enantiômeros. Através da reação com N, N'-dissuccinimidilcarbonato, essa proteína foi imobilizada em sílica funcionalizada com aminopropilsilano (partículas 5 μm e poros de 120Å) para constituir o recheio da coluna Utron ES-OVM (PINKERTON *et al.*, 1995; ROCKLAND TECHNOLOGIES, 1995).

A coluna preparada com a glicoproteína ovomucóide covalentemente ligada é extremamente útil para realizar uma ampla variedade de separações quirais envolvendo compostos ácidos, básicos e neutros. Esta coluna reconhece grupos capazes de formar pontes de hidrogênio, sítios polares, iônicos e hidrofóbicos, bem como a estrutura tridimensional das moléculas da amostra (PINKERTON *et al.*, 1995; ROCKLAND TECHNOLOGIES, 1995).

Coluna CHIRAL-AGP

Uma das mais promissoras fases protéicas foi desenvolvida pôr HERMANSSON e agora é comercializada pela Chrom Tech como CHIRAL AGP (HERMANSSON, 1984; SCHILL *et al.*, 1986).

A coluna CHIRAL AGP[®] é constituída pela α_1 -glicoproteína ácida imobilizada em partículas de sílica de 5 μm , esféricas e porosas. O seletor quiral, α_1 -glicoproteína ácida é uma proteína acídica composta pôr 181 aminoácidos com ponto isoelétrico 2,7 e massa molecular de 45000 Da (ENQUIST & HERMANSSON, 1990).

Esta proteína contém muitos grupos de características diferentes, como grupos ácidos e básicos e grupos capazes de formar pontes de

hidrogênio, tendo também um caracter hidrofóbico moderado, uma vez que possui alguns grupos de aminoácidos hidrofóbicos como triptofano, lisina e fenilalanina (ENQUIST & HERMANSSON, 1990). A α_1 -glicoproteína ácida possui resíduos de ácido aspártico e um grupo serina terminal negativamente carregados. Seus grupos positivamente carregados estão presentes nos resíduos lisina, arginina e histidina. Os sítios quirais aparecem na cadeia peptídica e também nas 4 unidades de carboidrato ligados á proteína pelos resíduos de aspargina, que constituem 45% de sua massa molecular (SCHILL *et al.*, 1986).

Estudos de fluorescência demonstraram que a forma imobilizada da α_1 -AGP possui uma estrutura um pouco diferente de sua forma nativa. Contudo, existe grande similaridade entre a forma nativa e a forma imobilizada dessa proteína no que diz respeito ao reconhecimento quiral (ENQUIST & HERMANSSON, 1990).

Colunas baseadas nessa proteína têm sido utilizadas para separação direta de uma grande variedade de compostos quirais, como aminas primárias, secundárias e terciárias, ácidos e compostos não proteolíticos. A retenção e a seletividade quiral são altamente dependentes da temperatura e do pH. Modificadores, carregados ou não, irão afetar a retenção e, em alguns casos, um aumento significativo na enantiosseletividade poderá ser observado. Certos solventes podem causar mudanças conformacionais na proteína (SCHILL *et al.*, 1986).

1.5 A Propafenona e seus Metabólitos

A propafenona (2'-[2-hidroxi-3-(propilamino)propoxi]-3-fenilpropiofenona) (PPF), um potente antiarrítmico, anestésico local e estabilizador da membrana da célula miocárdica, vem sendo empregada para o tratamento e profilaxia de todas as formas de extra-sístoles, taquicardias e taquiarritmias ventriculares e supra-ventriculares (BIRGERSDOTTER-GREEN, 1992; LIMA, 1994). Estudos recentes têm demonstrado que a PPF também apresenta atividade β -bloqueadora que, embora correspondente a 2,5 a 5% da atividade do propranolol, pode ser de significância clínica em razão da maior dose de PPF empregada na terapêutica. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a PPF também apresenta ação bloqueadora de canais de cálcio, no entanto 100 vezes menor que a do verapamil (LEDDA, *et al.*, 1983; BIRGERSDOTTER-GREEN, 1992).

Pôr via *per oral*, a PPF é rapidamente absorvida, com tempo para atingir a concentração plasmática máxima de aproximadamente 3 horas. Em razão do extenso metabolismo pré-sistêmico, a biodisponibilidade varia de 3 a 40 %, sendo provavelmente dependente da dose administrada. O volume de distribuição varia de 2,5 a 4,0 L/kg e cerca de 95 % do fármaco é ligado a α_1 -glicoproteína ácida (GILLIS *et al.* 1985, SIDDOWAY *et al.*, 1987; KROEMER *et al.*, 1989), logo, mudanças mínimas no grau de ligação podem modificar as concentrações nos sítios de ação, com significantes implicações clínicas (GILLIS *et al.*, 1985). A metabolização da PPF (**FIGURA 7**) leva à formação de dois metabólitos ativos: N-despropilpropafenona (PPF-NOR) e 5-hidroxi-propafenona (PPF-5OH) (HAEFELI *et al.*, 1991).

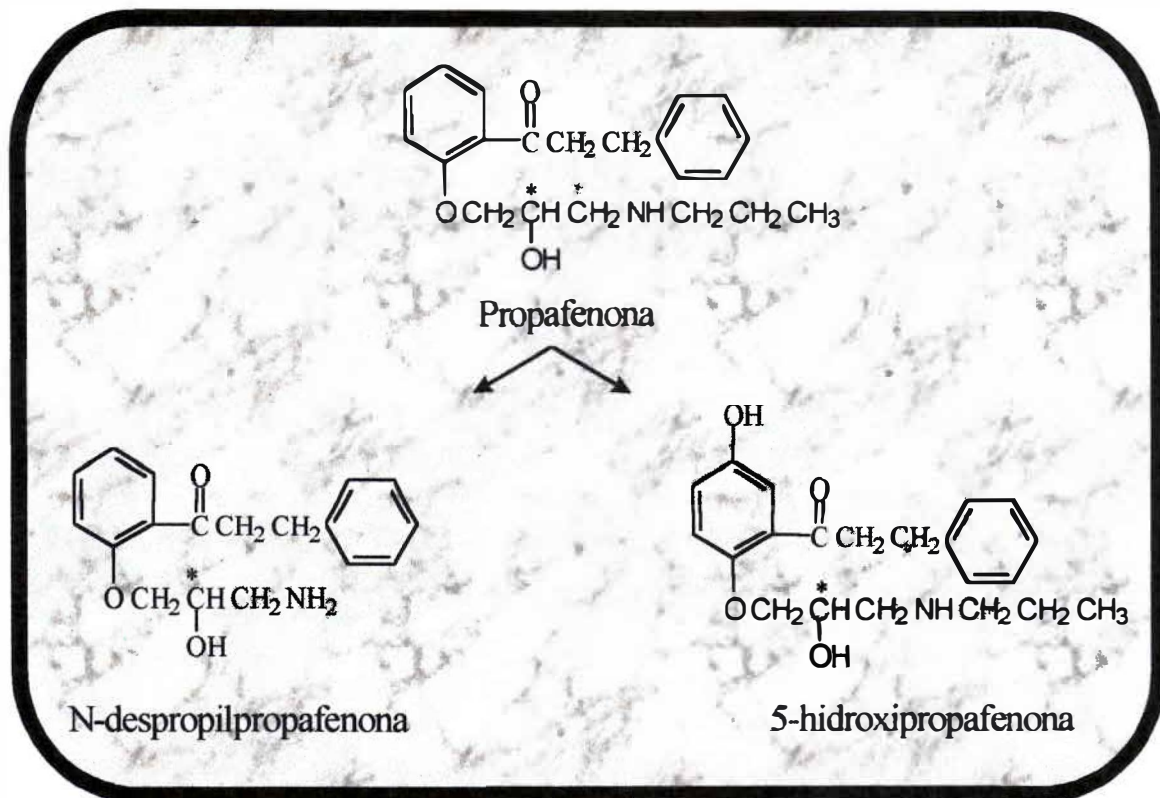


FIGURA 7 Estrutura da propafenona (PPF) e de seus dois metabólitos ativos

A PPF-5OH é equivalente ao fármaco inalterado no que se refere a ação antiarrítmica, apresentando entretanto, menor ação β -bloqueadora. A PPF-NOR é menos ativa em sua habilidade de bloquear os canais de sódio e na supressão de arritmias ventriculares (MALFATTO *et al.*, 1988; BIRGERSDOTTER-GREEN, 1992; SIDDOWAY, *et al.*, 1987).

Durante a terapia oral crônica, as concentrações plasmáticas da PPF-5OH e PPF-NOR são de aproximadamente 25 e 10% do fármaco inalterado, respectivamente, contribuindo também para o efeito terapêutico. Esses metabólitos são excretados nas fezes e na urina (BIRGERSDOTTER-GREEN, 1992).

A 5-hidroxilação da PPF, catalisada pela enzima do citocromo P450 CYP_{2D6}, é polimórfica; 7 a 10 % da população caucasiana apresenta baixa

atividade dessa enzima, sendo chamados de metabolizadores lentos. Estudos indicam que as enzimas envolvidas na N-desalquilação da PPF são CYP_{1A2} e CYP_{3A4} (BOTSCH *et al.*, 1992; SIDDOWAY *et al.*, 1987; KROEMER *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1990).

A metabolização deficiente da PPF é caracterizada por um aumento na meia-vida de eliminação, elevadas concentrações plasmáticas da PPF, baixa depuração oral, relação não linear dose/concentração plasmática e ausência da PPF-5OH detectável no plasma (SIDDOWAY *et al.*, 1987 ; KROEMER *et al.*, 1989).

A disposição cinética da PPF também é estereosseletiva havendo predominância do enantiômero (S) no plasma. Dados farmacocinéticos indicam ainda que a depuração do enantiômero (S) é consideravelmente reduzido quando a PPF é administrada como uma mistura racêmica, resultando num aumento significativo das concentrações plasmáticas da (S)-PPF e aumento na sua meia-vida de eliminação. Experimentos recentes com microsomas de fígado humano, indicam que o citocromo P450 CYP_{2D6} promove a 5-hidroilação da (S)-PPF, que representa a maior rota metabólica "in vivo". Esta metabolização é inibida pelo enantiômero (R) de maneira competitiva. Já que a atividade β-adrenérgica está relacionada principalmente ao enantiômero (S), a inibição de seu metabolismo pode ter implicações clínicas (KROEMER *et al.*, 1991; KROEMER *et al.*, 1994).

Até o momento, não há dados sobre as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos enantiômeros dos metabólitos da PPF, provavelmente em razão da carência de metodologia.

1.6 Separação dos Enantiômeros da PPF e de seus Metabólitos

A separação dos enantiômeros da PPF foi descrita pela primeira vez por KROEMER *et al.* (1989), através da derivação com o reagente quiral 2,3,4,5-tetra-*o*-acetil- β -glucopiranosilisotiocianato e posterior separação dos diastereoisômeros em coluna de fase reversa (RP-18). Apesar deste método ter sido empregado para a análise dos enantiômeros em plasma com aplicação em estudos farmacocinéticos de dose múltipla, o procedimento de extração proposto envolveu muitas etapas com conseqüente perda de 60 % dos enantiômeros, o que levou a obtenção de limites de quantificação da ordem de 100 ng/mL.

No estudo descrito por MEHVAR (1990), também baseado na derivação quiral, mas com o reagente (R)-naftiletilisocianato, um procedimento de extração simplificado resultou em limites de quantificação de 6,25 ng/mL, valor compatível com estudos farmacocinéticos de dose única.

Os dois estudos acima apresentam como desvantagem a necessidade de uma reação de derivação com reagentes quirais que podem levar à racemização, mesmo quando são utilizados reagentes enantiomericamente puros. Assim, PREVOT *et al.* (1992) propuseram a separação dos enantiômeros da PPF através da utilização de uma fase móvel contendo o seletor quiral N-benzoilcarbonilglicil-L-prolina. O grande consumo do reagente quiral na fase móvel e o limite de quantificação de 100 ng/mL representaram grandes desvantagens do método proposto. Mais recentemente, KERN (1994) empregou o aditivo quiral N-*tert*-*boc*-L-prolina na fase móvel obtendo, limites de quantificação da ordem de 5 ng/mL, mas ainda com a desvantagem do elevado consumo do seletor quiral.

A utilização de fases estacionárias quirais para a separação de enantiômeros minimiza a possibilidade de racemização e facilita a resolução dos enantiômeros, em razão do grande número de colunas disponíveis comercialmente. HOLLENHORST & BLASCHKE (1991) utilizaram colunas baseadas em derivados de celulose e amilose para a resolução dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos. Para ilustrar o procedimento, os autores relataram a análise dos enantiômeros da PPF em plasma, no entanto, o método foi aplicado na análise de uma única amostra colhida no pico de concentração plasmática e nenhum detalhe foi dado a respeito da sensibilidade do método e conseqüente possibilidade de aplicação em estudos de disposição cinética. Em outro estudo, a coluna CHIRALCEL OD[®] (derivado tris-3,5 dimetilfenilcarbamato da celulose) foi empregada para a resolução dos enantiômeros da PPF em plasma, mas também sem qualquer informação sobre a aplicação do método para quantificação dos enantiômeros (ABOUL-ENEIN & BARK, 1993). Recentemente, BHÖM *et al.* (1995) relataram outro método para a determinação da PPF-5OH como racemato e dos enantiômeros da PPF em plasma utilizando a coluna CHIRALPAK AD[®]. O método devidamente validado, apresentou limite de quantificação de 10 ng/mL para cada enantiômero da PPF, podendo ser utilizado em estudos de disposição cinética porém, os autores não realizaram a resolução dos enantiômeros dos metabólitos da PPF (BHÖM *et al.*, 1995).

Todos esses métodos descritos fazem uso de colunas quirais em condições de fase normal, ou seja, com fases móveis constituídas por hexano e um álcool, normalmente 2-propanol. Em um estudo bastante recente De GAITANI *et al.* (1998) relataram a análise dos enantiômeros da PPF também em condição de

fase reversa, utilizando a coluna CHIRALCEL ODR[®]. O método descrito foi adequadamente validado e apresentou limites de quantificação de 25 ng/mL para os dois enantiômeros da PPF (De GAITANI *et al.*, 1998).

Através dos dados aqui apresentados, pode-se observar que os métodos descritos na literatura baseados no uso de fases estacionárias quirais são adequados apenas para quantificar os enantiômeros do fármaco inalterado. No entanto, a quantificação dos enantiômeros dos metabólitos da PPF, principalmente da PPF-5OH, também é importante para uma melhor compreensão das propriedades cinéticas desse fármaco.

Objetivos

- ◆ Avaliar várias colunas quirais baseadas em proteínas e em derivados de celulose e amilose para a **resolução** dos enantiômeros da propafenona e de seus metabólitos.

- ◆ Desenvolver metodologia estereosseletiva para a **resolução** e **quantificação** dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH, em plasma, com sensibilidade e seletividade compatíveis com a aplicação em estudos de disposição cinética.

Materiais e Métodos

3.1 Equipamentos e Colunas Cromatográficas

Todas as análises foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU (Kyoto, Japão) composto por uma bomba modelo LC 10 AS, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD 10 A, um integrador modelo CHROMATOPAC CR6A e um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostradores de 20 e 50 μL . As colunas cromatográficas foram adquiridas de Chiral Technologies, Exton, PA, EUA (CHIRALCEL OD-H[®], 150 x 4,6 mm, partículas de 5 μm ; CHIRALCEL OD-R[®], 250 x 4,6 mm, partículas de 10 μm e CHIRALPAK AD[®], 250 x 4,6 mm, partículas de 10 μm), J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA (CHIRAL AGP[®], 150 x 4,0 mm, partículas de 5 μm) e Rockland Technologies, Newport, DE, EUA (ULTRON ES-OVM[®], 150 x 4,6 mm, partículas de 5 μm).

Foram utilizados ainda um agitador-aquecedor FANEM, modelo 258, um agitador de tubos PHOENIX, modelo AP56, um pHmetro Incibrás, uma centrífuga Exelsa Baby-FANEM, modelo 206-I e um agitador horizontal PACHANE.

3.2 Solventes e Reagentes

Os solventes grau cromatografia empregados na preparação das fases móveis foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) ou da EM Science (Gibbstown, NJ, EUA). A dietilamina e o ácido trifluoroacético foram obtidos da Carlo Erba (Milão, Itália). O diclorometano empregado no procedimento de extração dos fármacos das amostras de plasma foi obtido

da EM Science (Gibbstown, NJ, EUA). Os demais reagentes grau p.a. empregados para a preparação das soluções tampão foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As soluções aquosas utilizadas na preparação das fases móveis e a solução tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ empregada no procedimento de extração da PPF e PPF-5OH do plasma foram preparadas com água purificada no sistema MILLI-Q-plus/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA), e filtradas em membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ /Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA). Uma vez preparadas, as fases móveis aquosa/orgânica foram desgaseificadas no ultrassom/vácuo durante 10 minutos.

3.3 Fármaco e Metabólitos

As substâncias fumarato de nor-propafenona, cloridrato de 5-hidroxiopropafenona e cloridrato de propafenona foram gentilmente cedidos por KNOLL S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e KNOLL AG (Ludwigshapen-Rhein, Alemanha).

3.4 Avaliação das Colunas Quirais

Para realização dos testes de avaliação das colunas quirais, foram preparadas as soluções-padrão de fumarato de nor-propafenona, cloridrato de 5-hidroxiopropafenona e cloridrato de propafenona nas concentrações de 10,0 e 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em metanol.

A análise cromatográfica dos padrões foi feita segundo o procedimento abaixo (FIGURA 8). A detecção da PPF e seus metabólitos foi realizada em 254 nm para as colunas CHIRAL AGP[®], ULTRON ES-OVM[®], CHIRALCEL ODR[®], e em 300 nm para as colunas CHIRALCEL OD-H[®], CHIRALPAK AD[®]. Esta mudança no comprimento de onda de detecção nas análises realizadas nas colunas que operam em condições de fase normal foi necessária para melhorar a estabilidade da linha de base.

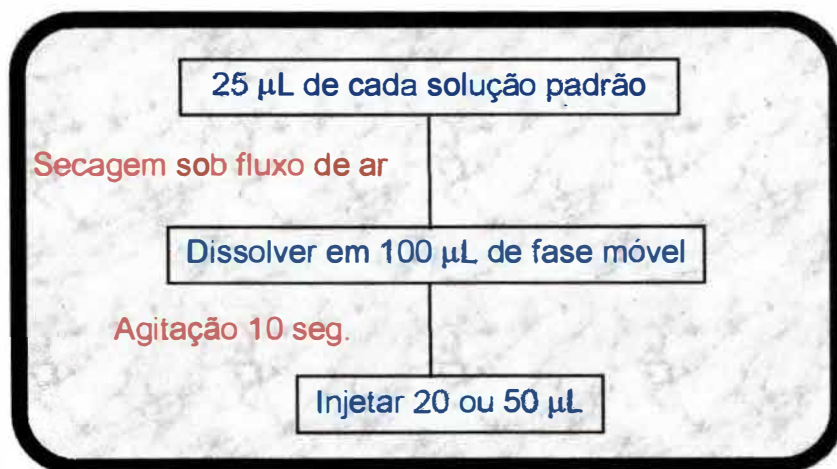


FIGURA 8 Preparação da amostra para a análise cromatográfica

3.4.1 Cálculos dos parâmetros cromatográficos

Fator de retenção (k)

O fator de retenção (k) para cada enantiômero foi calculado através da fórmula:

$$k_1 = t_{R1} - t_m / t_m$$

$$k_2 = t_{R2} - t_m / t_m$$

sendo,

t_{R1} e t_{R2} = tempos de retenção em minutos do primeiro e segundo enantiômero, respectivamente.

t_m = tempo de retenção de um composto não retido, considerado como sendo o sinal obtido quando da injeção da fase móvel.

Fator de separação (α)

Na análise dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos, estão envolvidos dois componentes, que são os próprios enantiômeros. Neste caso, a avaliação da separação é feita através do fator de separação α , calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção. O fator de separação sempre trata de dois picos adjacentes (COLLINS, 1995).

$$\alpha = k_2 / k_1$$

3.4.2 Determinação da configuração absoluta e ordem de eluição dos enantiômeros da PPF-5OH e PPF-NOR

Os dados da literatura indicam apenas a configuração absoluta da PPF e nada foi descrito até o momento para os seus metabólitos (HOLLENHORST & BLASCHKE, 1991; PREVOT *et al.*, 1992; ABOUL-ENEIN & BARK, 1993; KERN, 1994; BÖHM *et al.*, 1995). Sendo assim, essa informação foi obtida através do emprego da coluna CHIRALPAK AD[®] e detecção por dicroísmo circular. Esse experimento, realizado no Centro di Studio per le Macromolecole ed Otticamente Attive-CNR do Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale,

Università di Pisa, forneceu simultaneamente a ordem de eluição dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos nessa coluna.

Para determinar a ordem de eluição nas demais colunas efetuou-se a separação dos enantiômeros na coluna CHIRALPAK AD® e as frações contendo cada enantiômero isoladamente foram coletadas na saída da coluna. Após evaporação do solvente, os resíduos foram dissolvidos e analisados em cada uma das outras colunas, utilizando uma fase móvel que permitiu a resolução dos enantiômeros em questão.

3.5 Análise da PPF e PPF-5OH em plasma

Considerando os resultados obtidos nos experimentos realizados na avaliação das colunas cromatográficas, selecionou-se as seguintes condições para o desenvolvimento do método de análise da PPF e PPF-5OH em plasma:

Coluna: CHIRALPAK AD®

Fase estacionária: Amilose 3,5-dimetilfenilcarbamato.

Fase móvel: Hexano:etanol (88:12) + DEA 0,1%.

Detecção: 315 nm.

Vazão da Fase Móvel: 1,3 mL/min.

Pressão: 25 atm.

3.5.1 Procedimento de Extração

O procedimento empregado para extração da PPF e PPF-5OH das amostras de plasma foi a alcalinização do plasma com tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ 0,1 mol/L, pH=11, e extração com diclorometano, segundo método desenvolvido por BÖHM *et al.* (1995). A alcalinização do plasma com NaOH, 0,1 mol/L, pH=11, não foi eficiente na extração dos enantiômeros da PPF-5OH, indicando que a utilização do tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ é imprescindível para a extração desse metabólito do plasma.

O procedimento proposto por BÖHM *et al.* (1995), foi eficiente na extração da PPF e de seu metabólito PPF-5OH, porém, infelizmente, resultou na presença de interferentes de componentes endógenos do plasma.

Assim, modificações adicionais tornaram-se necessárias. Dois novos passos foram introduzidos no procedimento de extração: a lavagem da fase orgânica com 200 μL do tampão $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$, pH=11 e em seguida, a fase orgânica lavada foi congelada durante uma noite. Na manhã do dia seguinte, as amostras foram transferidas para novos tubos, sendo que o resíduo aquoso e as prováveis impurezas permaneciam congelados e aderidos às paredes do primeiro tubo. Dessa maneira, somente a fase orgânica (que continuava líquida devido ao seu menor ponto de fusão) foi transferida para os novos tubos.

O procedimento de preparação da amostra está esquematizado na **FIGURA 9**.

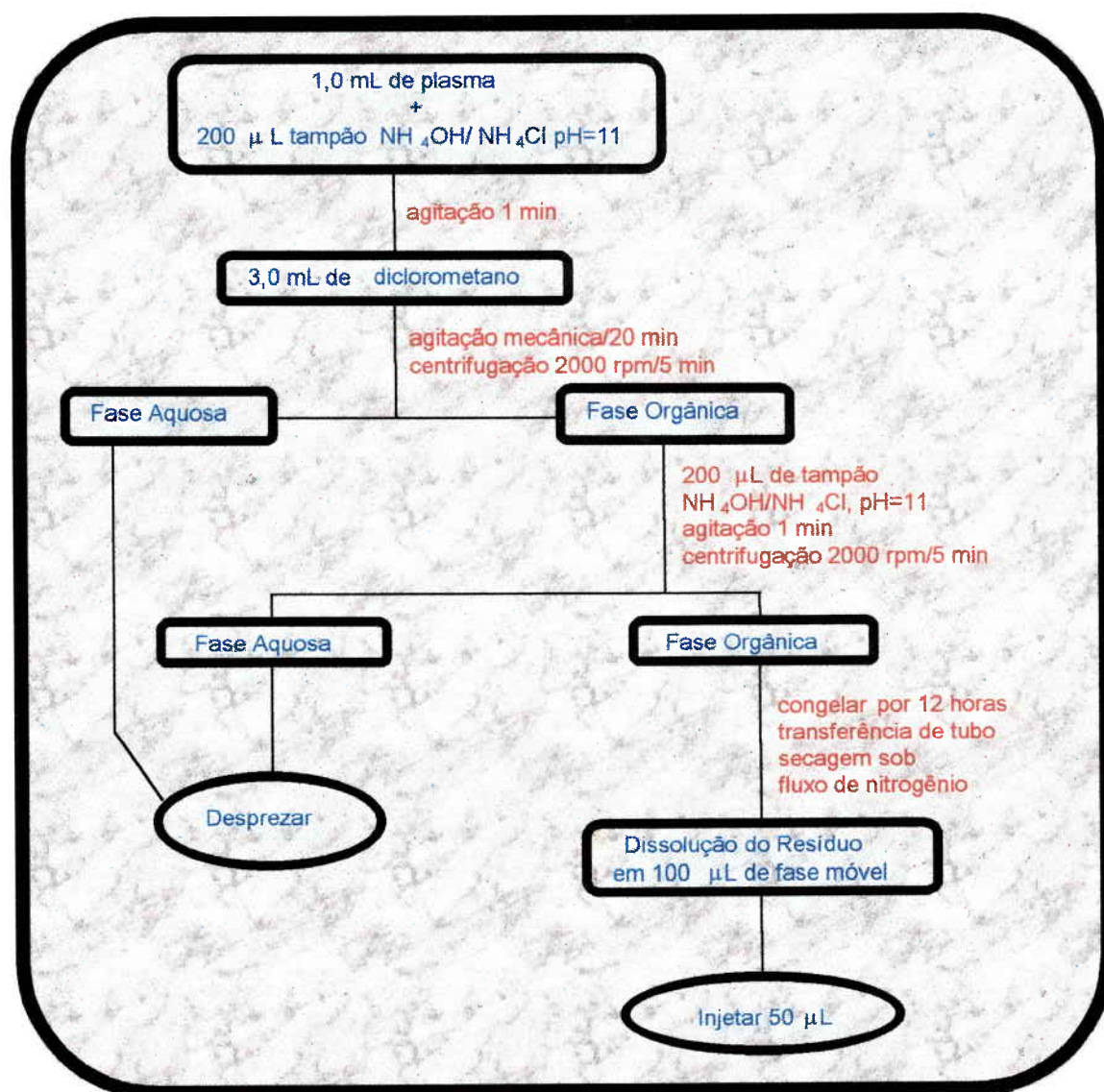


FIGURA 9 Procedimento de extração

3.5.2 Validação do método e análise estatística

Para padronização de um método analítico são necessários os seguintes ensaios: curva de calibração, linearidade, recuperação, repetibilidade, exatidão, sensibilidade e seletividade. Para a realização desses experimentos foram empregadas soluções-padrão de cloridrato de 5-hidroxiopropafenona e cloridrato de propafenona preparadas em uma

solução metanólica de HCl 0,01 mol/L, nas concentrações de 2, 10, 20, 40 e 100 µg/mL.

A **TABELA 5** apresenta os parâmetros utilizados para a validação do método desenvolvido (CHASIN *et al.*, 1994).

TABELA 5 Parâmetros utilizados na validação do método e análise estatística

Parâmetro	Definição	Unidade
Recuperação	Eficiência do processo de extração.	%
Linearidade	Faixa de concentração plasmática com relação linear entre concentração e resposta.	ng/mL
Repetibilidade	Precisão intra-ensaio: variação dos resultados em análises realizadas no mesmo dia (n = 10). Precisão interensaios: variação dos resultados em análises realizadas em 5 dias consecutivos.	CV %
Exatidão	Avalia a variação entre o valor real e o valor obtido experimentalmente.	%
Limite de Quantificação	Considerado como sendo a menor concentração do fármaco quantificado com erro inferior a 10 %.	ng/mL
Seletividade	Interferentes endógenos e outros fármacos co-administrados.	min

*CV= coeficiente de variação.

Curva de calibração e linearidade

Para a construção das curvas de calibração, 25µL das soluções-padrão de PPF e PPF-5OH nas concentrações 2, 10, 20 e 40 µg/mL foram transferidas para tubos de extração com tampas esmerilhadas. Após evaporação do metanol, adicionou-se 1 mL de plasma e efetuou-se o procedimento de

extração, descrito na **FIGURA 9**, e análise cromatográfica. A linha de regressão foi obtida, relacionando as concentrações plasmáticas de cada enantiômero (25 a 500 ng/mL) no eixo das abcissas e a altura dos picos obtidos no eixo das ordenadas.

A linearidade do método de análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH foi avaliada de forma similar, na faixa de concentração plasmática de 25 a 1250 ng/mL para cada enantiômero.

Recuperação

A avaliação da recuperação foi realizada através da construção de uma curva de calibração obtida pela injeção direta das soluções-padrão de PPF e PPF-5OH, após evaporação do solvente e dissolução do resíduo na fase móvel. A seguir, amostras de plasma contendo concentrações dos enantiômeros no intervalo de 25 a 500 ng/mL foram analisadas em duplicata, após o procedimento de extração. A concentração dessas amostras foi calculada com base na curva de calibração que não foi submetida à extração. A recuperação (R) foi calculada através da fórmula (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 b):

$$R = \text{concentração obtida} \times 100 / \text{concentração real}$$

Exatidão e repetibilidade

A exatidão e repetibilidade foram verificadas em estudos intra e interensaios. Foram preparadas amostras de plasma adicionadas de 50, 200 e 1000 ng/mL de cada enantiômero. Essas amostras foram divididas em alíquotas que foram congeladas, para uso posterior.

Para avaliação da exatidão e repetibilidade intra-ensaio, foram analisadas dez amostras (n=10) de um mesmo lote; para os estudos interensaios, foram

considerados os resultados obtidos na análise de cinco diferentes lotes, realizadas em cinco dias diferentes, em duplicata, para cada concentração.

Limite de quantificação

A sensibilidade do método foi avaliada utilizando o limite de quantificação como parâmetro, ou seja, a menor concentração do fármaco quantificado com erro inferior a 10% (SHAH *et al.*, 1992).

Para determinação do limite de quantificação, além das soluções normais usadas para construção das curvas de calibração, foram tomados 25 μL da solução-padrão da PPF e PPF-5OH na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, correspondente à concentração plasmática de 12,5 ng/mL de cada enantiômero. Após a evaporação do metanol, foi adicionado 1,0 mL de plasma branco e a amostra obtida foi submetida ao procedimento de extração.

Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise de soluções-padrão de diversos fármacos com possibilidade de serem interferentes do método e avaliando a separação cromatográfica através da coincidência dos tempos de retenção com os enantiômeros da PPF e da PPF-5OH.

Portanto, alíquotas correspondentes às concentrações plasmáticas terapêuticas máximas de cada uma das soluções-padrão foram levadas à *secura* e analisadas após a adição da fase móvel. Nos casos em que se observou interferência do fármaco na análise da PPF e PPF-5OH, repetiu-se o experimento, após submeter o fármaco ao procedimento de preparação da amostra, avaliando dessa forma, a eficiência do procedimento de extração na eliminação da interferência.

3.5.3 Aplicação do método

Uma vez desenvolvido, o método foi empregado na análise de amostras coletadas de um voluntário, para o qual administrou-se 1 comprimido de Ritmonorm[®], 150 mg. O voluntário foi informado sobre o estudo e forneceu o seu consentimento por escrito. Uma vez administrado o medicamento, efetuou-se uma coleta após 3,0 horas, sendo que o sangue coletado foi acondicionado em um tubo heparinizado. Os plasmas foram imediatamente separados por centrifugação e congelados para uso posterior.

Resultados e Discussão

4.1 Avaliação das Colunas Quirais

Esta etapa do trabalho consistiu primeiramente em realizar a avaliação das colunas baseadas em derivados de polissacarídeos CHIRALPAK AD[®], CHIRALCEL OD-R[®], CHIRALCEL OD-H[®] e das colunas baseadas em proteínas ULTRON ES-OVM[®] e CHIRAL AGP[®], através de variações na composição da fase móvel.

As fases móveis empregadas na avaliação das colunas foram constituídas por misturas de solventes orgânicos (fase normal) ou solução tampão acrescida de um modificador orgânico (fase reversa) para controlar sua polaridade e seletividade.

Uma vez que a separação cromatográfica é regulada por um balanceamento de afinidade do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária, e sendo que a fase móvel é quem determina o tipo e a força de interação entre o solvente e amostra, torna-se bastante adequado demonstrar as características químicas mais importantes (como índice de polaridade, capacidade receptora ou doadora de prótons, forças dispersivas e momento dipolar) para os solventes utilizados nas análises realizadas (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 a).

O índice de polaridade é uma resultante de todas as propriedades químicas e indica quantitativamente a força de interação entre os solventes frente a solutos polares. As forças dispersivas indicam a polarizabilidade de uma molécula, aumentando com o número de elétrons dos átomos que a compõem e com as distâncias desses elétrons em relação ao núcleo. A capacidade doadora ou receptora de prótons é uma medida da capacidade das moléculas de trocar

prótons e o momento dipolar se refere à capacidade de uma molécula para formar dipolos permanentes e está diretamente relacionado com a constante dielétrica do solvente (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 a). A **TABELA 6** resume as principais características dos solventes utilizados para variar as condições de análise nas colunas empregadas nesse estudo.

TABELA 6 Principais características dos solventes utilizados para alterar a seletividade das fases móveis (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 a)

Solvente	P.E. (°C)	Vis.(cps) 25°C	Índice de Polaridade	Força Dispersiva	Doador de Prótons	Receptor de Prótons	Momento dipolar	Grupo
Água	100	0.89	9.0	-	0.40	0.34	0.26	-
Acetonitrila	82	0.34	6.2	0.04	0.33	0.26	0.41	VI
1-propanol	97	1.90	4.1	-0.15	0.54	0.19	0.27	II
2-propanol	82	1.90	4.3	-0.30	0.54	0.20	0.26	II
Etanol	78	1.08	5.2	-0.23	0.51	0.21	0.28	II
Metanol	65	0.54	6.6	0.03	0.51	0.19	0.30	II

A contribuição de cada tipo de interação, em qualidade e magnitude, serviu para agrupar os solventes de comportamento similares em um diagrama triangular de indubitável utilidade para escolha de solventes em função de sua seletividade (**FIGURA 10**).

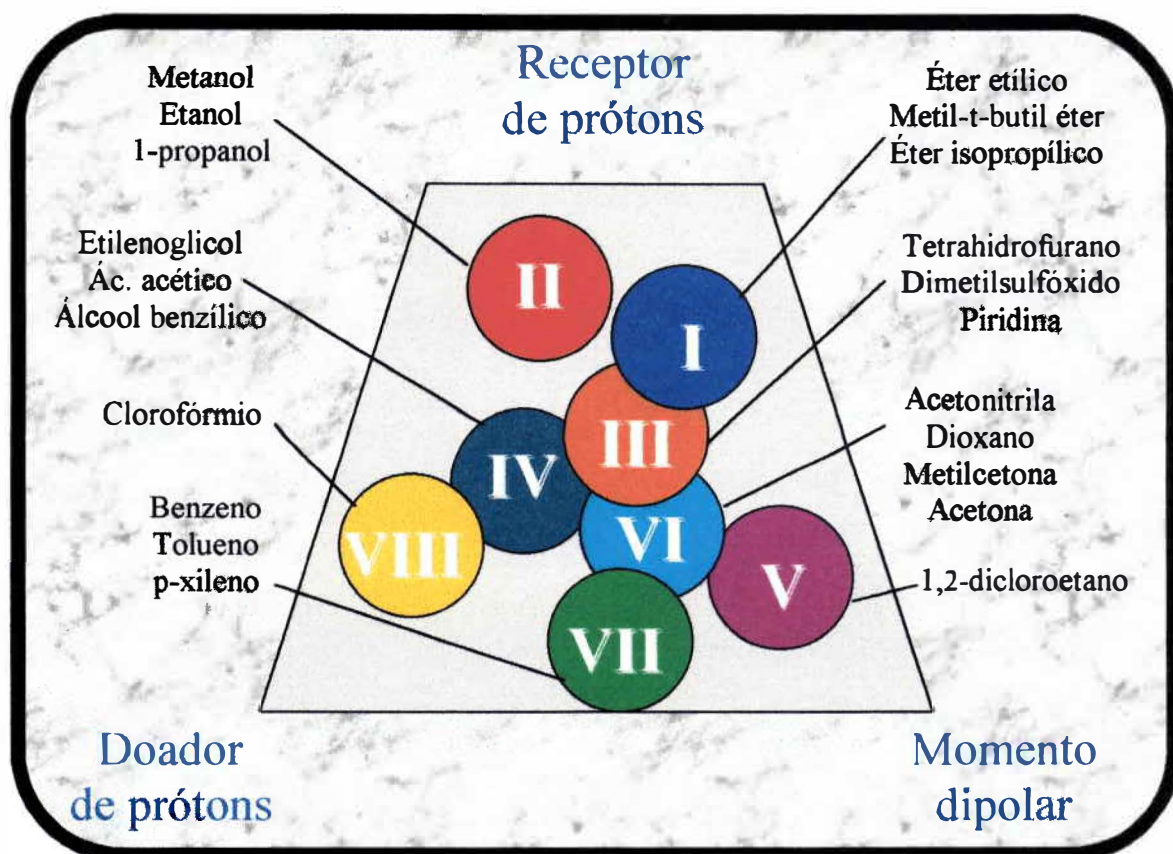


FIGURA 10 Grupos de seletividade dos solventes normalmente empregados em CLAE (QUATTROCCHI et al, 1992 a)

4.1.1 Avaliação das Colunas que operam em condições de fase reversa

Nesta fase do trabalho, as colunas ULTRON ES-OVM[®], CHIRAL AGP[®] e CHIRALCEL ODR[®] foram testadas com diferentes fases móveis, visando estabelecer o comportamento cromatográfico (fator de retenção e fator de separação) dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos. Para avaliar a influência da polaridade da fase móvel, o tipo e a porcentagem de modificador orgânico foram variados utilizando fases móveis compostas por solução

tampão:álcool ou solução tampão:acetonitrila, em diferentes proporções. Os parâmetros pH e concentração do tampão também foram variados.

A seleção dos componentes das fases móveis bem como das condições de operação, obedeceu às características de cada coluna quiral, sempre respeitando os limites recomendados pelos fabricantes, sob pena de danificar a coluna, seja pela diminuição de sua vida útil ou pela alteração de suas propriedades enantiosseletivas. Isso explica a não utilização de alguns solventes de uso comum em cromatografia (ROCKLAND TECHNOLOGIES, 1995; CHROM TECH, 1993; CHIRAL TECHNOLOGIES, 1994).

A **TABELA 7** resume as principais características e os limites de operação das colunas de fase reversa testadas nesta etapa do trabalho.

4.1.1.1 Avaliação da coluna ULTRON ES-OVM[®]

A coluna ULTRON ES-OVM[®] utiliza a proteína ovomucóide como seletor quiral e é indicada para a resolução de compostos de natureza ácida, básica e neutra (KIRKLAND *et al.*, 1991). Esta coluna foi avaliada através da mudança do pH da fase móvel (3,5-6,0), natureza e concentração do tampão utilizado (10-50 mmol/L) e também pela adição de diferentes modificadores orgânicos (metanol, etanol e acetonitrila) em diferentes proporções.

A **FIGURA 11** ilustra os resultados obtidos na avaliação da coluna ULTRON ES-OVM[®], enquanto a **TABELA 8** apresenta as fases móveis utilizadas

e os valores dos fatores de retenção (k) para o primeiro enantiômero eluído e dos fatores de separação (α).

TABELA 7 Características e limites de operação das colunas que operam em condições de fase reversa (CHROM TECH, 1993; CHIRAL TECHNOLOGIES, 1994; ROCKLAND TECHNOLOGIES, 1995)

	CHIRALCEL OD-R®	CHIRAL AGP®	ULTRON ES-OVM®
Tipo de FEQ	Derivado de celulose	Protéica	Protéica
Seletor Quiral	Celulose tris-(3,5dimetilfenil carbamato)	α_1 -glicoproteína ácida	Glicoproteína ovomucóide
Dimensões	250x4,6 mm	100x4,0 mm	100x4,6 mm
Suporte	Sílica	Sílica	Sílica
Tamanho da part.	10 μ m	5 μ m	5 μ m
Ponto isoelétrico	-	2,7	3,8-4,3
Temperatura °C	5-40	5-30	<40
Pressão máx.(atm)	50	140	200
Vazão máx.(mL/min)	1,5	0,9	-
Solventes(%)			
-acetonitrila	0-80	10	50
-metanol	0-80	-	50
-etanol	0-80	5	50
-1-propanol	-	10	-
-2-propanol	-	10	50
Tampão/Sal			
-tipo	Perclorato de sódio <1mol/L	Fosfato de sódio ou potássio, 0,01 a 0,02 mol/L acetato de sódio e amônio/citrato de sódio e amônio 0,01 a 0,1 mol/L	Fosfato de sódio ou potássio, <70 mmol/L
pH	2-6	3-7	3-7
Regeneração	Metanol, 0,5 mL/min-3h.	2-propanol 25% em água, 24h ou Tampão fosfato 0,01mol/L:2-propanol (85:15), pH 3,5-0,5mL/min-2h	Acetonitrila:água (1:1)
Armazenamento	Metanol	Água:2-propanol (9:1)	Acetonitrila:água (1:1)

Recomendações após uso diário:

*Nas fases protéicas, o tampão deve ser removido através da eluição de água pela coluna.

*Na fase CHIRALCEL ODR®, o tampão deve ser removido através da eluição de água:solvente orgânico na mesma proporção da fase móvel.

FEQ=Fase estacionária quiral.

TABELA 8 Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna ULTRON ES-OVM®

Composição da Fase Móvel	Parâmetros Cromatográficos					
	PPF		PPF-5OH		PPF-NOR	
	k	α	k	α	k	α
pH						
Tampão acetato 20 mmol/L:metanol (95:5)						
3,5	3,40	1,00	0,40	1,67	0,47	1,00
Tampão fosfato 20 mmol/L:metanol (95:5)						
4,5	8,08	1,09	3,87	1,48	2,80	1,00
5,0	29,53	1,13	6,13	1,58	6,47	1,17
5,5	-	-	8,95	1,53	10,34	1,05
6,0	-	-	10,48	1,32	22,27	1,05
Concentração do tampão						
Tampão acetato pH 3,5:metanol (95:5)						
10	3,60	1,00	0,47	1,85	0,60	1,00
20	3,40	1,00	0,40	1,67	0,47	1,00
50	1,87	1,00	0,40	1,50	0,47	1,00
% de Acetonitrila						
Tampão acetato 20 mmol/L, pH 3,5:acetonitrila						
0	-	-	3,61	2,30	4,48	1,00
3	9,80	1,00	1,00	1,80	1,20	1,00
5	5,27	1,00	0,67	1,60	0,80	1,00
Modificador Orgânico						
Tampão acetato 20 mmol/L, pH 3,5:modificador (95:5)						
etanol	1,80	1,00	0,13	1,60	0,27	1,00
metanol	3,40	1,00	0,40	1,67	0,47	1,00
acetonitrila	5,27	1,00	0,67	2,53	0,80	1,00

Vazão= 1,0 mL/min.; k= fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído; α = fator de separação.

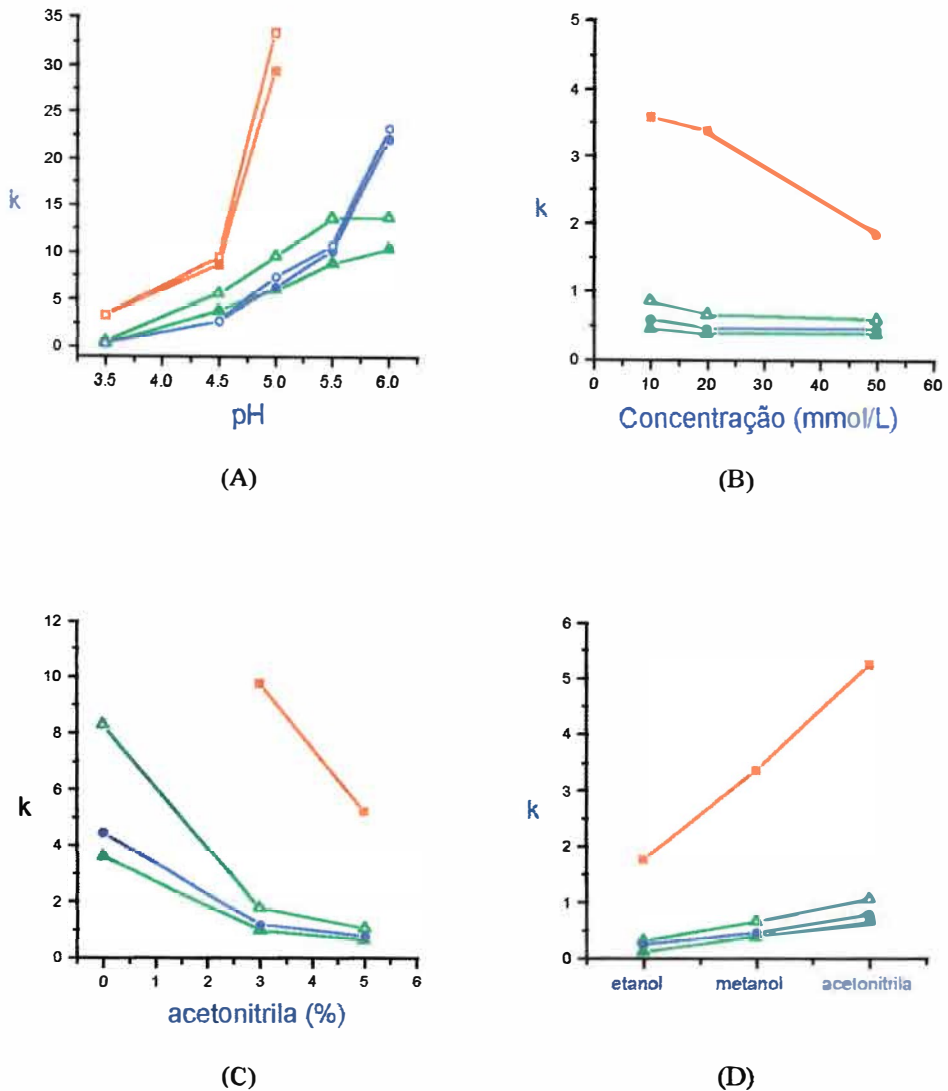


FIGURA 11 Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna ULTRON ES-OVM®

□- (R)-PPF △- (R)-PPF-5OH ○- (R)-PPF-NOR
 ■- (S)-PPF ▲- (S)-PPF-5OH ●- (S)-PPF-NOR

Fases móveis descritas na Tabela 8.

-Avaliação da Influência do pH na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna ULTRON ES-OVM®

A proteína ovomucóide é neutra na faixa de pH de 4,0-4,6, apresenta carga positiva em valores menores de pH e carga negativa em valores de pH acima desse intervalo. Isso pode explicar os dados mostrados na FIGURA 11-A e

na **TABELA 8**, onde se pode observar que à medida em que se aumenta o pH da fase móvel os fatores de retenção também aumentam. Quando a fase móvel tampão fosfato 20 mmol/L, pH 6,0 ou pH 5,5:metanol (5%) foi utilizada, não houve eluição da PPF em 1 hora de análise.

Os resultados apresentados na **TABELA 8** sugerem que os mecanismos de reconhecimento quiral estão baseados em interações hidrofóbicas, mas que os solutos interagem também nos sítios de troca iônica da proteína. A medida em que o pH aumenta, a quantidade de cargas negativas na proteína deve aumentar, o que leva a um aumento na retenção da PPF e de seus metabólitos (**FIGURA 11-A**). Mudanças no pH podem levar também à mudanças conformacionais da proteína alterando a possibilidade de interação nos sítios quirais (ARVIDSSON & JANSSON, 1992). Através dos dados ilustrados na **TABELA 8**, verifica-se que a mudança do pH ocasionou alterações significativas nos fatores de separação, principalmente da PPF-5OH, o que também pode ser consequência das mudanças conformacionais na proteína.

-Avaliação da influência da concentração do tampão na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna ULTRON ES-OVM®

A partir dos dados apresentados na **FIGURA 11-B** e na **TABELA 8**, pode-se concluir que em baixos valores de concentração do tampão, a retenção é maior em razão de interações eletrostáticas (ARVIDSSON & JANSSON, 1992). À medida em que a concentração do tampão é aumentada, o número de íons em solução também aumenta, resultando em uma pequena redução nos tempos de

retenção por um efeito de troca iônica (KIRKLAND, *et al.* 1991). As interações eletrostáticas entre o soluto e a proteína, provavelmente diminuem de intensidade levando a uma eluição mais rápida (PINKERTON *et al.*, 1995; SCHILL *et al.*, 1986).

Analisando os valores dos fatores de separação apresentados na **TABELA 8**, verifica-se que houve uma discreta piora na resolução dos enantiômeros da PPF-5OH, provavelmente devido ao aumento dos íons na fase móvel, o que leva ao menor tempo de interação do soluto com os sítios de reconhecimento quiral. Este fato reforça a possibilidade do mecanismo de reconhecimento quiral basear-se principalmente em interações eletrostáticas e hidrofóbicas (ARDBISSON & JANSSON, 1992).

-Avaliação da influência da proporção do modificador orgânico na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna ULTRON ES-OVM®

Como visto anteriormente, pode-se alcançar alterações significativas na enantiosseletividade de colunas quirais alterando a polaridade da fase móvel, pela adição de solventes orgânicos em diferentes proporções. Na coluna ULTRON ES-OVM®, esse fator foi testado através da utilização de diferentes proporções de acetonitrila na fase móvel composta por tampão acetato 20 mmol/L, pH 3,5 (**TABELA 8**).

Através da alteração da proporção do modificador orgânico também observa-se mudanças nos tempos de retenção, conforme o esperado para cromatografia em fase reversa, sendo que o aumento na proporção do solvente

orgânico resulta em um aumento da força de eluição da fase móvel, com conseqüente diminuição dos fatores de retenção (**FIGURA 11-C**). Isto pode ser explicado pelo aumento da afinidade do soluto pela fase móvel ou pela redução das interações hidrofóbicas entre o soluto e a fase estacionária (ROCKLAND TECHNOLOGIES, 1995).

Com relação à separação dos compostos analisados, à medida que a proporção do modificador é aumentada, verifica-se uma diminuição nos fatores de separação que pode ser atribuído a um menor tempo de interação entre o soluto e a fase estacionária, resultando numa eluição mais rápida dos enantiômeros (**FIGURA 11-C**).

-Avaliação da influência do tipo de modificador orgânico na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna ULTRON ES-OVM®

Através da **FIGURA 11-D**, pode-se observar que o aumento no índice de polaridade do solvente (**TABELA 6**) na fase móvel, pela adição de etanol e metanol (**TABELA 8**), resulta em um aumento nos fatores de retenção da PPF-5OH; o mesmo acontece para a PPF-NOR e PPF. Esse comportamento é esperado para fase reversa, já que eles pertencem ao mesmo grupo de solventes (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 a).

Este fato pode ser explicado pela afinidade da PPF e de seus metabólitos pelos sítios apolares da proteína (interações hidrofóbicas). Desta forma, à medida em que aumenta o índice de polaridade da fase móvel, a afinidade pela fase

móvel diminui, fazendo com que o fator de retenção aumente (ARVIDSSON & JANSSON, 1992).

Porém, sendo a acetonitrila um solvente com índice de polaridade intermediário em relação ao etanol e o metanol (**TABELA 6**), o comportamento observado não corresponde ao esperado. Isto pode ser explicado através do efeito de seletividade do solvente. Os álcoois empregados pertencem ao grupo doador/receptor de prótons e, portanto, devem solubilizar a PPF e seus metabólitos de forma mais eficaz, reduzindo a sua retenção. Uma outra possibilidade seria a variação da conformação da proteína frente a solventes de grupos diferentes, causando a exposição de novos sítios de interação quando se usa a acetonitrila como modificador orgânico, o que levaria a um aumento na retenção do soluto, como ilustra a **FIGURA 11-D**.

O fator de separação da PPF-5OH também foi fortemente influenciado pelo tipo de modificador orgânico adicionado à fase móvel. Analisando-se os dados apresentados na **TABELA 8**, verifica-se que quando utilizou-se acetonitrila, o fator de separação da PPF-5OH aumentou sensivelmente em relação ao obtido quando se utiliza metanol ou o etanol. Provavelmente, isto ocorreu em função de alterações conformacionais na proteína, levando a alterações na cavidade quiral ou a exposição de novos sítios de reconhecimento quiral (PINKERTON *et al.*, 1995; ROCKLAND TECHNOLOGIES, 1995).

A coluna ULTRON ES-OVM[®] resolveu adequadamente apenas os enantiômeros da PPF-5OH, (**FIGURA 12**) enquanto a PPF e a PPF-NOR apresentaram resolução parcial, porém os picos obtidos não eram simétricos.

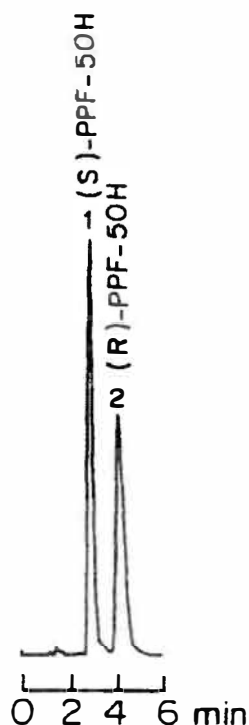


FIGURA 12 Resolução dos enantiômeros da PPF-5OH na coluna ULTRON ES-OVM[®]

Fase móvel: Tampão acetato 20 mmol/L, pH 3,5:acetonitrila (97:3), vazão: 0,9 mL/min; Detecção em 254 nm.

4.1.1.2 Avaliação da coluna CHIRAL AGP[®]

A coluna CHIRAL AGP[®] também foi utilizada para avaliação da influência da composição da fase móvel na retenção e separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos. Os resultados obtidos foram similares aos obtidos na avaliação da coluna ULTRON ES-OVM[®], porém, esta coluna apresentou maior eficiência na resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-NOR, enquanto que os enantiômeros da PPF-5OH não foram resolvidos. A **FIGURA 13** ilustra os resultados obtidos na avaliação da coluna CHIRAL AGP[®], enquanto a **TABELA 9**

apresenta as fases móveis utilizadas, os valores dos fatores de retenção para os primeiros enantiômeros eluídos e dos fatores de separação obtidos.

TABELA 9 Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRAL AGP®

Composição da Fase Móvel	Parâmetros Cromatográficos					
	PPF		PPF-5OH		PPF-NOR	
	k	α	k	α	k	α
pH						
Tampão fosfato 10 mmol/L:1-propanol (92:8)						
4,5	4,53	1,10	1,00	1,00	1,00	1,00
5,0	5,60	1,13	3,33	1,00	3,40	1,00
5,5	11,27	1,14	6,07	1,00	6,07	1,09
6,0	20,73	1,16	11,67	1,00	11,00	1,07
Concentração do tampão						
Tampão fosfato pH 5,5:1-propanol (92:8)						
10	11,27	1,14	6,07	1,00	6,07	1,12
50	10,00	1,17	4,33	1,00	4,60	1,09
100	4,80	1,17	2,40	1,00	2,47	1,00
% de 1-propanol						
Tampão fosfato 10 mmol/L, pH 5,5:1-propanol						
5	16,41	1,16	6,87	1,00	6,79	1,12
8	11,27	1,14	6,07	1,00	6,07	1,09
10	6,33	1,13	4,07	1,00	3,67	1,00
Modificador Orgânico						
Tampão fosfato 100 mmol/L, pH 5,5:modificador (92:8)						
acetonitrila	22,27	1,08	5,67	1,00	5,67	1,07
1-propanol	4,80	1,17	2,40	1,00	2,47	1,00
2-propanol	6,60	1,20	2,80	1,00	3,07	1,06
etanol	19,07	1,31	5,20	1,00	5,07	1,10
metanol	-	-	14,87	1,00	11,80	1,15

Vazão= 0,9 mL/min.; k=fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído; α = fator de separação.

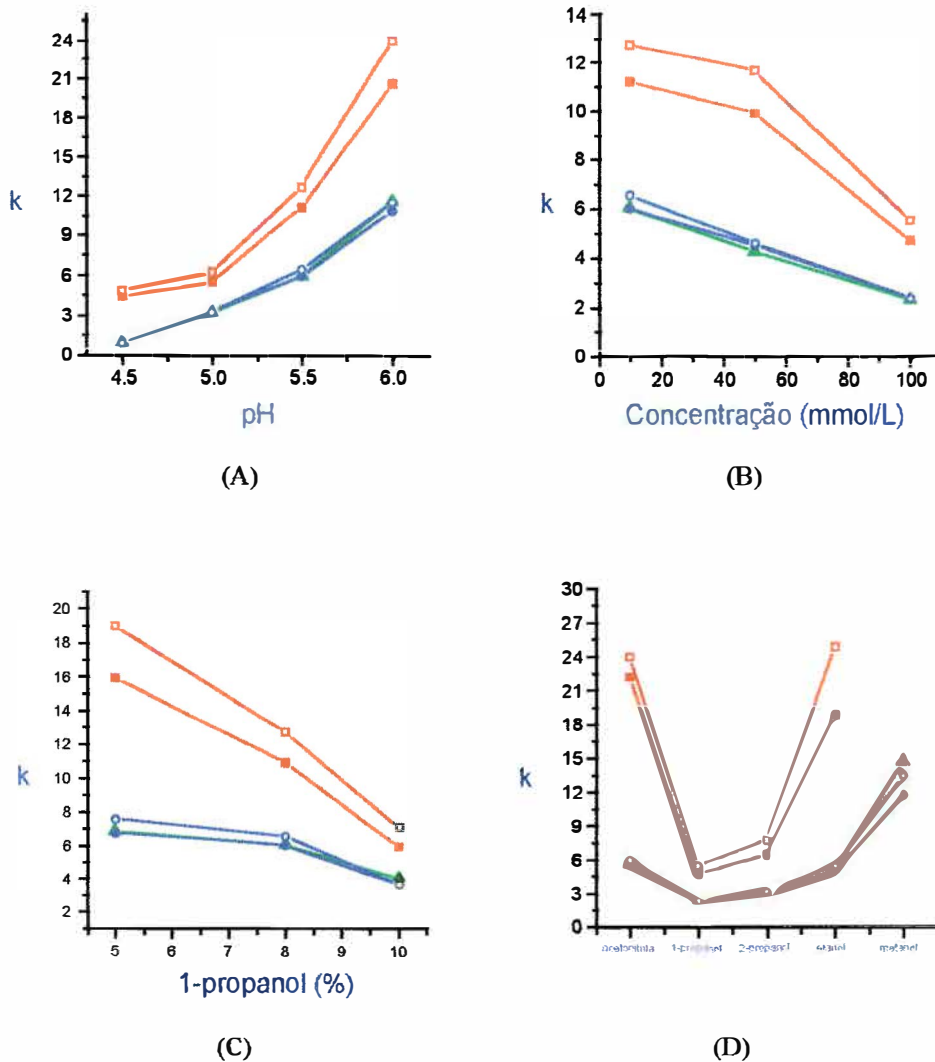


FIGURA 13 Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRAL AGP®

□ - (R)-PPF △ - (R)-PPF-5OH ○ - (R)-PPF-NOR
 ■ - (S)-PPF ▲ - (S)-PPF-5OH ● - (S)-PPF-NOR

Fases móveis descritas na Tabela 9.

A exemplo da coluna ULTRON ES-OVM®, conforme se eleva o pH, ocorre um aumento dos fatores de retenção, tanto para a PPF quanto para os seus metabólitos, com uma pequena melhora na separação dos enantiômeros da PPF e da PPF-NOR (FIGURA 13-A).

Através da **FIGURA 13-B** pode-se observar que o aumento da concentração do tampão acarreta uma diminuição da retenção dos enantiômeros de todos os compostos. Quanto à separação, foi observada uma redução dos fatores de separação da PPF-NOR, que não foi resolvida na concentração de 100 mmol/L (**TABELA 9**).

O raciocínio empregado para discutir a influência da concentração e do pH do tampão utilizado na coluna ULTRON ES-OVM[®] também é aplicável à coluna CHIRAL AGP[®].

Na fase móvel constituída por tampão fosfato 10 mmol/L, pH 5,5 e diferentes quantidades de 1-propanol, observa-se que à medida em que a proporção do modificador orgânico é aumentada, os tempos de retenção diminuem, comportamento esperado para fase reversa. Com relação à separação, o aumento da proporção do modificador provoca uma pequena diminuição dos fatores de separação da PPF e PPF-NOR, sendo que os enantiômeros da PPF-NOR não foram resolvidos quando se utilizou uma quantidade de modificador orgânico superior a 8% (**FIGURA 13-C**).

Com relação aos modificadores orgânicos, pode-se observar que aumentando o índice de polaridade do solvente na fase móvel constituída por tampão fosfato pH 5,5, 100 mmol/L e 8% dos modificadores 1-propanol, 2-propanol, etanol, acetonitrila e metanol (**TABELA 9**), aumentam também os tempos de retenção da PPF e dos seus metabólitos, o que é um comportamento esperado para uma coluna de fase reversa (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 a).

A separação também foi significativamente alterada em função do tipo de modificador orgânico adicionado à fase móvel. Os enantiômeros da PPF-5OH

não foram resolvidos com nenhuma destas fases móveis. A FIGURA 14 ilustra a separação obtida para os enantiômeros da PPF e PPF-NOR.

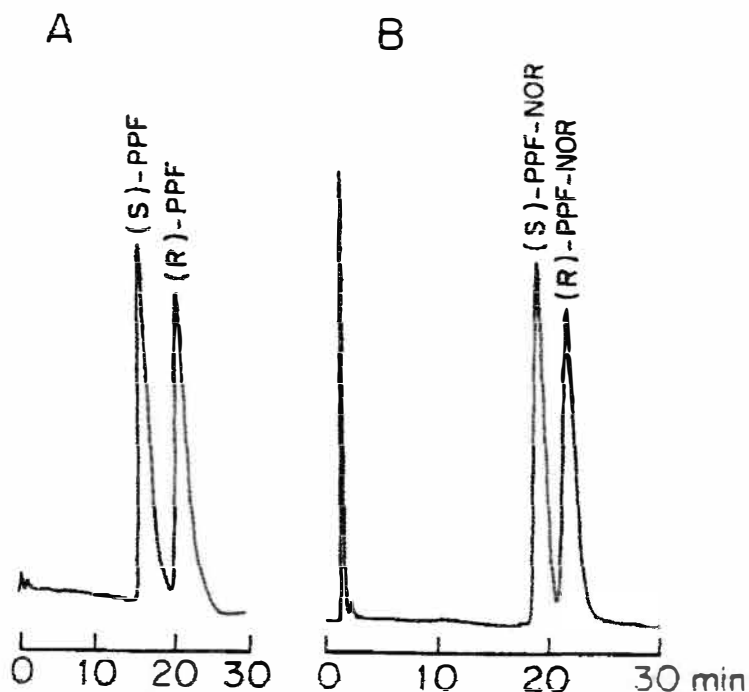


FIGURA 14 Resolução dos enantiômeros da PPF (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRAL AGP®

Fase móvel: A) tampão fosfato 10 mmol/L, pH 5,5:1-propanol (92:8); B) tampão fosfato 100 mmol/L, pH 5,5-metanol (98:2), vazão: 0,9 mL/min. Detecção: 254 nm.

4.1.1.3 Avaliação da coluna CHIRALCEL ODR®

Para avaliar a coluna CHIRALCEL OD-R® foram alterados os parâmetros pH, concentração da solução de perclorato de sódio e proporção do modificador orgânico. A avaliação do tipo de modificador orgânico não pôde ser realizada pois o uso de 1-propanol e 2-propanol como solventes na fase móvel não é recomendado pelo fabricante. Além disso, tanto o etanol quanto o metanol, quando adicionados à fase móvel perclorato de sódio 0,25 mol/L, pH 5,0,

tornaram-na muito viscosa, resultando em pressões de operação incompatíveis com a pressão máxima recomendada pelo fabricante. A **TABELA 10** apresenta as fases móveis utilizadas para avaliar a coluna CHIRALCEL ODR[®], enquanto a **FIGURA 15** ilustra também a influência da composição da fase móvel sobre os fatores de retenção.

TABELA 10 Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL OD-R[®]

Composição da Fase Móvel	Parâmetros Cromatográficos					
	PPF		PPF-5OH		PPF-NOR	
	k	α	k	α	k	α
pH						
Perclorato de sódio 0,25 mol/L:acetonitrila (60:40)						
3,0	6,79	1,07	2,97	1,00	2,62	1,11
4,0	6,33	1,07	2,77	1,00	2,50	1,06
5,0	6,29	1,07	2,78	1,00	2,45	1,06
5,5	6,57	1,06	2,99	1,00	2,70	1,04
Concentração (mol/L)						
Perclorato de sódio pH 5,5:acetonitrila (60:40)						
0,1	5,75	1,04	2,58	1,00	2,42	1,00
0,25	6,57	1,06	2,99	1,00	2,70	1,04
0,5	7,91	1,07	3,44	1,00	3,12	1,02
% de acetonitrila						
Perclorato de sódio 0,25 mol/L, pH 5,0:acetonitrila						
30	29,90	1,10	10,09	1,00	8,09	1,09
35	15,17	1,09	5,40	1,00	4,72	1,08
40	6,29	1,07	2,78	1,00	2,45	1,06

Vazão= 0,8 mL/min.; k=fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído; α = fator de separação.

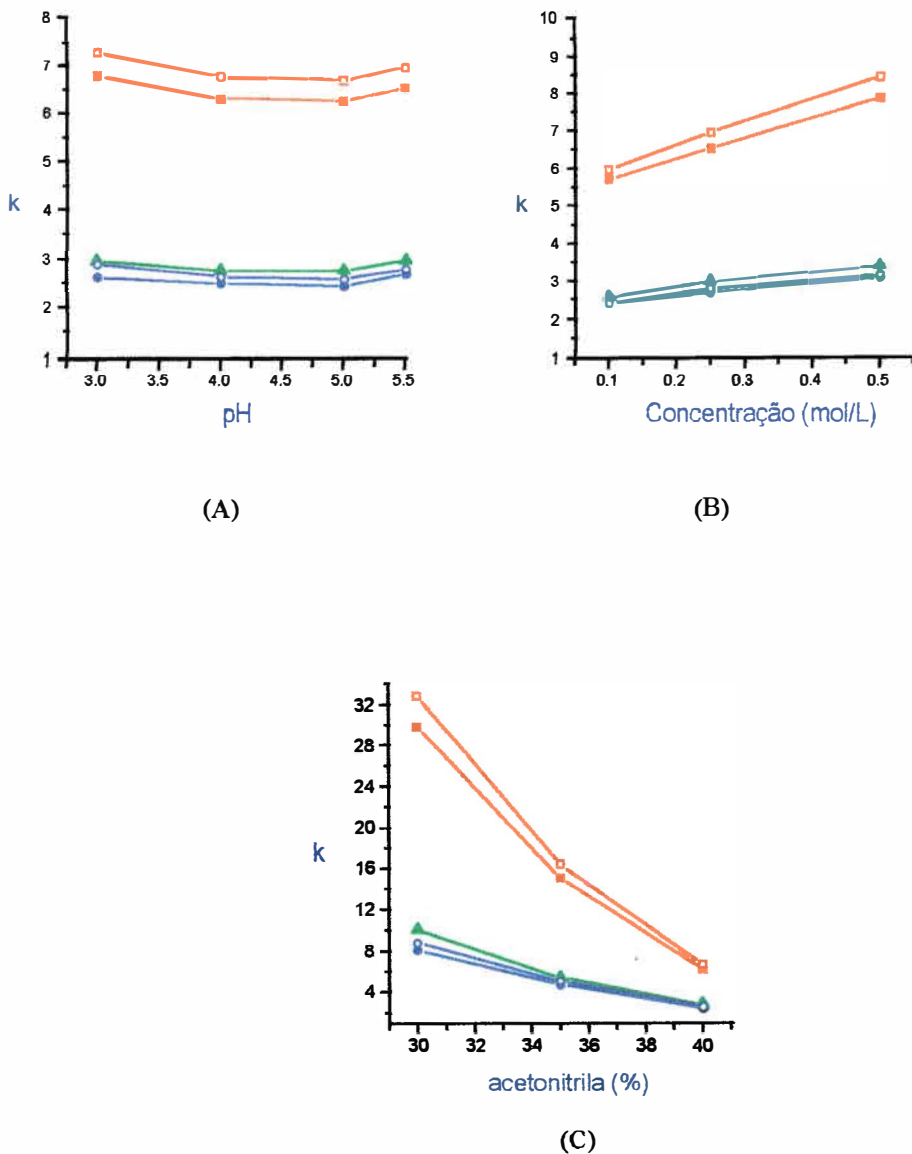


FIGURA 15 Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALCEL ODR®

□ - (R)-PPF △ - (R)-PPF-5OH ○ - (R)-PPF-NOR
■ - (S)-PPF ▲ - (S)-PPF-5OH ● - (S)-PPF-NOR

Fases móveis descritas na Tabela 10.

-Avaliação da Influência do pH na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL-ODR®

Quando houve variação do pH na fase móvel perclorato de sódio 0,25 mol/L:acetonitrila (60:40), não foi observada nenhuma alteração significativa nos fatores de retenção (**FIGURA 15-A**) ou nos fatores de separação (**TABELA 10**). Este fato vem reforçar a hipótese de ISHIKAWA e SHIBATA (1993), que atribui à retenção e enantiosseletividade a presença do ânion perclorato, que atua em um mecanismo semelhante a formação de pares iônicos.

-Avaliação da influência da concentração de perclorato na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL ODR®

Através da análise dos dados apresentados na **FIGURA 15-B**, se observa que à medida em que se aumenta a concentração de perclorato na fase móvel, ocorre um pequeno aumento nos tempos de retenção, confirmando o mecanismo de formação de pares iônicos proposto por ISHIKAWA e SHIBATA (1993).

Com relação à enantiosseletividade, observa-se uma pequena melhora na separação da PPF com o aumento da concentração do perclorato, provavelmente devido a maior formação de pares iônicos (ISHIKAWA e SHIBATA, 1993). Já os enantiômeros da PPF-5OH e da PPF-NOR não apresentaram resolução satisfatória em nenhuma das fases testadas.

-Avaliação da influência da proporção do modificador orgânico na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL ODR®

Na coluna CHIRALCEL ODR[®], esse fator foi testado através da utilização de diferentes proporções de acetonitrila na fase móvel composta por perclorato de sódio 0,25 mol/L, pH 5,0 (**TABELA 10**). Quando foi utilizada a fase móvel constituída por acetonitrila:perclorato de sódio 0,25 mol/L, pH 5,0, foi observado que a diminuição da proporção do modificador acarretou um grande aumento dos tempos retenção (**FIGURA 15-C**), que pode ser explicado pela diminuição da força de eluição da fase móvel, em razão do aumento de seu índice de polaridade (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 a).

TANG (1996) atribuiu a diminuição dos tempos de retenção a uma possível competição entre o soluto e o modificador orgânico tanto pelo sítios quirais quanto pelos sítios não quirais da fase estacionária. Assim sendo, quanto maior a proporção de modificador na fase móvel, maior o número de moléculas de solvente competindo com o soluto pelos mesmos sítios de ligação e menor serão os tempos de retenção dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos.

Quanto aos fatores de separação, houve uma melhora discreta na separação dos enantiômeros da PPF-NOR e PPF com a diminuição da proporção do modificador orgânico, fato que pode ser atribuído ao simples aumento no tempo de permanência dos compostos na coluna e também a um menor número de moléculas do solvente competindo com os solutos pelos sítios de reconhecimento quiral da fase estacionária (OKAMOTO & KAIDA, 1994).

A **FIGURA 16** ilustra a separação dos enantiômeros da PPF e PPF-NOR na coluna CHIRALCEL ODR[®]. Os enantiômeros da PPF-OH não foram resolvidos com nenhuma das fases móveis empregadas.

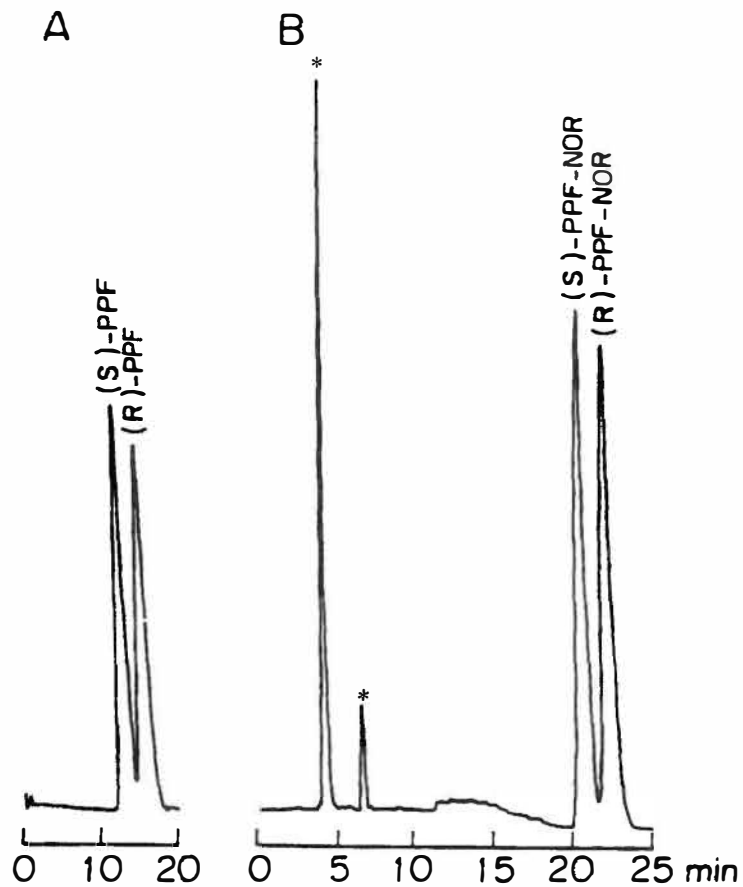


FIGURA 16 Resolução dos enantiômeros da PPF (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRALCEL OD-R®

Fase móvel: A) NaClO₄ 0,25 mol/L, pH 4,0-acetonitrila (60:40), vazão: 0,8 mL/min; B) NaClO₄ 0,25 mol/L, pH 5,5-acetonitrila (70:30), vazão: 0,7 mL/min. Detecção: 254 nm. *Os picos não identificados em (B) são atribuídos a presença de prováveis impurezas na vidraria ou na amostra injetada.

4.1.2 Avaliação das colunas que operam em condições de fase normal

A segunda fase desta etapa do trabalho consistiu na avaliação das colunas de fase normal: CHIRALPAK AD® e CHIRALCEL OD-H®.

Essas colunas foram avaliadas através da utilização de diferentes fases móveis compostas por hexano:álcool, em diferentes proporções e acrescidas de aditivos orgânicos (ácido trifluoroacético ou dietilamina), sempre respeitando os limites recomendados pelos fabricantes. A **TABELA 11** resume as principais características e os limites de operação das colunas que operam em condições de fase normal avaliadas neste trabalho (CHIRAL TECHNOLOGIES,1995; CHIRAL TECHNOLOGIES, 1993).

TABELA 11 Características e limites de operação das colunas que operam em condições de fase normal (CHIRAL TECHNOLOGIES,1995; CHIRAL TECHNOLOGIES, 1993)

	CHIRALCEL OD-H®	CHIRALPAK AD®
Tipo de FEQ	Derivado de celulose	Derivado de amilose
Seletor Quiral	Celulose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)	Amilose tris (3,5-dimetilfenilcarbamato)
Dimensões	150x4,6 mm	250x4,6 mm
Suporte	Sílica	Sílica
Tamanho da partícula	5µm	10µm
Temperatura °C	0-40	0-40
Pressão máx.(atm)	50	30
Vazão máx.(mL/min)	1,5	1,5
Solventes(%)		
-hexano	0-100	0-100
-etanol	0-100	0-15 e 60-100
-2-propanol	0-100	0-100
Aditivos(%)		
-dietilamina	< 0.5	< 0.5
-ác. Trifluoroacético	< 0.5	< 0.5
Regeneração	Etanol 0,3 mL/min-3h.	Etanol 0,5 mL/min-3h.
Armazenamento	Hexano:2-propanol 9:1	Hexano:2-propanol 9:1

Recomendações após uso diário:

*Lavar as colunas com hexano:2-propanol (9:1), caso as fases móveis contenham dietilamina ou ácido trifluoroacético.

FEQ= Fase estacionária quiral.

4.1.2.1 Avaliação da coluna CHIRALPAK AD®

A TABELA 12 e FIGURA 17 apresentam a influência da composição da fase móvel na retenção e separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD®.

TABELA 12 Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD®

Composição da Fase Móvel	Parâmetros Cromatográficos					
	PPF		PPF-5OH		PPF-NOR	
	k	α	k	α	k	α
% de 2-propanol						
Hexano:2-propanol + dietilamina 0,1 %						
10	3,49	1,60	5,64	1,00	5,78	1,21
15	2,17	1,68	2,41	1,00	3,29	1,19
20	1,47	1,68	1,53	1,00	2,05	1,18
Tipo de Modificador Polar						
Hexano:álcool (85:15) + dietilamina 0,1 %						
2-propanol	2,17	1,68	2,41	1,00	3,29	1,19
etanol	2,03	1,89	2,27	1,26	4,13	2,27
% de Dietilamina						
Hexano:2-propanol (85:15) + dietilamina						
0	2,53	1,63	-	-	4,80	1,14
0,1	2,17	1,68	2,41	1,00	3,29	1,19
0,2	2,09	1,65	2,57	1,00	3,16	1,19
0,4	2,05	1,69	2,47	1,00	3,15	1,20
% de Ácido Trifluoroacético						
Hexano:2-propanol (85:15) + ác. trifluoroacético						
0	2,53	1,63	-	-	4,80	1,44
0,1	1,90	1,21	-	-	1,17	1,17
0,2	1,57	1,25	-	-	0,97	1,16

Vazão= 1,0 mL/min.; k= fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído; α = fator de separação.

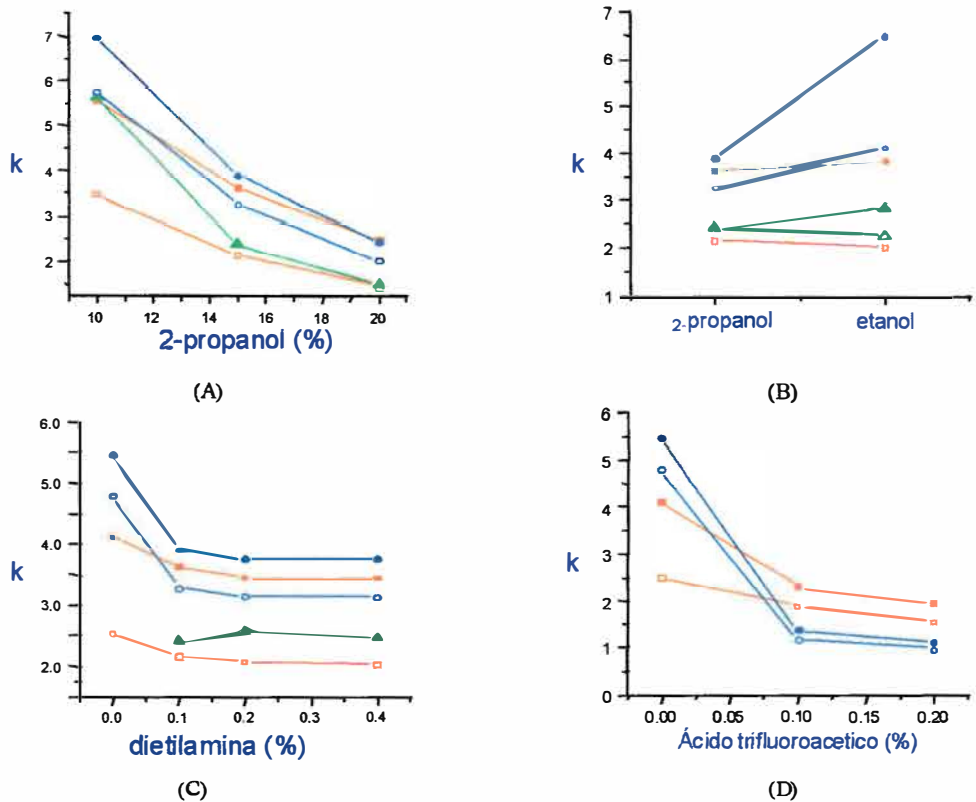


FIGURA 17 Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALPAK AD®

□- (R)-PPF △- (R)-PPF-5OH ○- (R)-PPF-NOR
 ■- (S)-PPF ▲- (S)-PPF-5OH ●- (S)-PPF-NOR

Fases móveis descritas na tabela 12.

-Avaliação da influência da porcentagem do modificador polar na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD®

Para a avaliação da influência da porcentagem de modificador polar na coluna CHIRALPAK AD®, foram utilizadas fases móveis compostas por hexano:2-propanol nas concentrações de 10, 15 e 20%, acrescidas de 0,1% de

dietilamina (**Tabela 12**). Nesta coluna é possível verificar que a retenção segue um mecanismo de fase normal, ou seja, aumentando a polaridade da fase móvel através da adição de 2-propanol, acontece uma redução na retenção de todos os compostos estudados. Em contraste, o fator de separação não foi significativamente influenciado pelo aumento da concentração de 2-propanol na fase móvel. Isto pode ser atribuído ao fato do modificador polar competir com os solutos pelos sítios quirais e não quirais da fase estacionária. Quando a competição não ocorre nos sítios de reconhecimento quiral da fase estacionária pode haver uma redução da retenção sem ocasionar uma redução do fator de separação (TANG, 1996; KUNATH *et al.*, 1996; ABOUL ENEIN & BARK, 1993).

-Avaliação da influência do tipo de modificador polar na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD[®]

Para avaliar a influência do tipo de modificador polar nas propriedades de retenção e de separação da coluna CHIRALPAK AD[®], foram utilizadas fases móveis compostas de hexano:etanol e hexano:2-propanol na proporção (85:15), acrescidas de 0,1 % de dietilamina. Ao contrário do observado na avaliação da influência da porcentagem do modificador polar, o efeito da estrutura do álcool na seletividade da coluna CHIRALPAK AD[®] foi muito acentuado.

Quando o 2-propanol foi substituído pelo etanol (**Tabela 12**), não se observou redução dos tempos de retenção da PPF como esperado, devido ao aumento na polaridade (**Figura 17-B**). Além disso, os enantiômeros da PPF-5OH

que não eram separados nas outras fases móveis, passaram a ser completamente resolvidos.

Esse efeito pode ser atribuído ao fato do álcool adicionado à fase móvel modificar a cavidade quirál do polissacarídeo. A amilose possui uma estrutura reconhecidamente menos rígida que a celulose, assim, com a alteração do tipo do álcool, podem ocorrer alterações conformacionais nas cavidades quirais da fase estacionária, levando a esse comportamento distinto (KUNATH *et al.*, 1996; TANG, 1996).

-Avaliação da influência de aditivos na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD®

A utilização de ácidos e bases orgânicas como aditivos na fase móvel, para aumentar a seletividade das colunas quirais baseadas em derivados de polissacarídeos, tem se mostrado um importante artifício para a separação de compostos ácidos e básicos. Tais substâncias são eficazes pois contribuem para a redução da formação de pontes de hidrogênio entre os solutos e os grupos silanóis residuais, remanescentes do processo de derivação da sílica, usado como suporte (TANG, 1996).

Para avaliar a influência da porcentagem de dietilamina na coluna CHIRALPAK AD®, foram utilizadas fases móveis compostas de hexano:2-propanol (85:15), acrescidas de dietilamina nas concentrações de 0,0 a 0,4%.

A concentração de dietilamina acarretou um efeito pouco acentuado na retenção da PPF, afetando, principalmente, a largura e simetria dos picos,

contribuindo para melhorar a separação (**Figura 17-C**). No caso dos metabólitos, a presença de 0,1% de dietilamina reduziu a retenção da PPF-NOR e possibilitou a eluição da PPF-5OH. Concentrações maiores afetaram apenas a simetria dos picos.

A **TABELA 12** mostra as fases móveis empregadas na avaliação da influência da porcentagem de ácido trifluoracético. Para fases móveis contendo 0,1% de ácido trifluoracético, observou-se redução nos tempos de retenção dos enantiômeros da PPF e da PPF-NOR, em comparação com a fase móvel que não contém este aditivo. Este fato pode ser explicado pela redução dos grupos silanóis residuais e também por um mecanismo de formação de pares iônicos entre o ácido trifluoroacético e os compostos analisados (TANG, 1996). Concentrações maiores de ácido trifluoracético não alteram a retenção e a seletividade significativamente. A PPF-5OH não eluiu em nenhuma das condições avaliadas.

A **FIGURA 18** apresenta os cromatogramas obtidos na resolução dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALPAK AD[®].

Vale ressaltar que esta foi a única coluna empregada no estudo que possibilitou a resolução dos enantiômeros de todos os compostos analisados, no entanto, os picos obtidos para a PPF-NOR sempre apresentaram assimetria, o que impediu a utilização dessa coluna para quantificação desse metabólito.

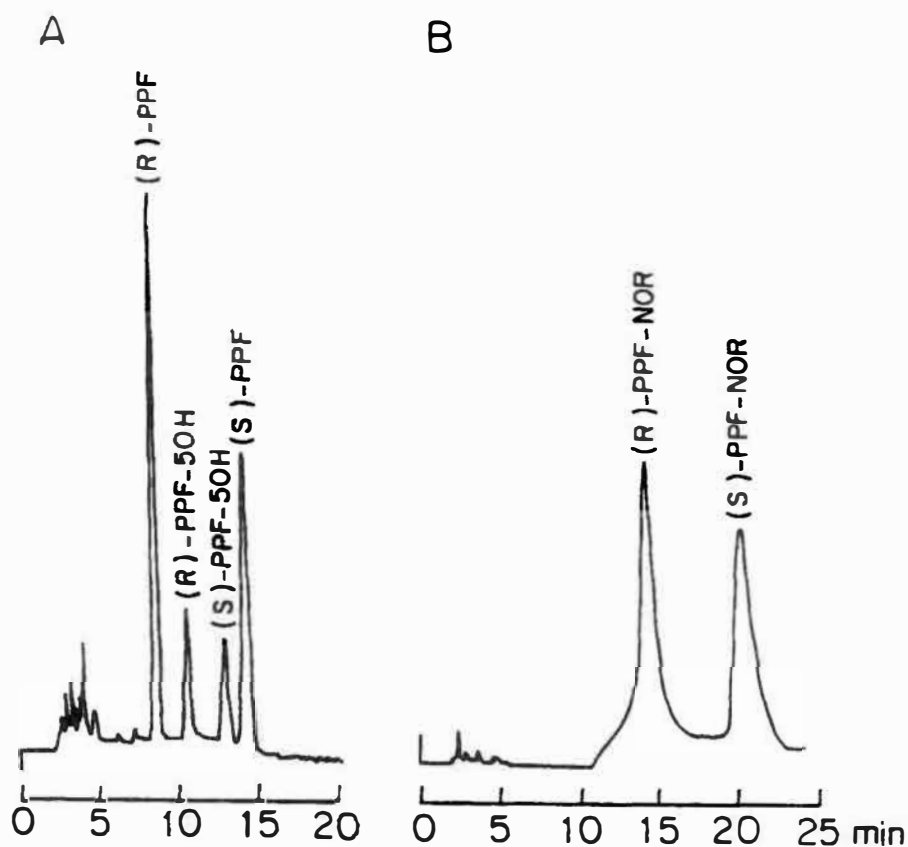


FIGURA 18 Resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRALPAK AD®

Fase móvel: A) hexano:etanol (88:12) + 0,1% de dietilamina; B) hexano:etanol (85:15). Vazão 1,3 mL/min. Detecção: 300 nm.

4.1.2.2 Avaliação da coluna CHIRALCEL OD-H®

Esta coluna é obtida à partir do mesmo derivado de celulose da coluna CHIRALCEL OD-R®, mas empregada em condições de fase normal, e difere da coluna CHIRALPAK AD® apenas quanto à natureza do polímero, pois utiliza celulose ao invés de amilose.

Para avaliar a coluna CHIRALCEL OD-H[®] foram alterados os parâmetros proporção e tipo de modificador polar, além da utilização dos aditivos dietilamina e ácido trifluoroacético, em diferentes concentrações. Isto foi conseguido através da utilização de fases móveis constituídas por hexano:etanol ou hexano:2-propanol, em diferentes proporções.

A coluna CHIRALCEL OD-H[®] apresentou comportamento similar à coluna CHIRALPAK AD[®]. Os resultados obtidos são apresentados na **TABELA 13** e **FIGURA 19**.

O comportamento observado foi o esperado para fase normal, ou seja, aumentando a polaridade da fase móvel, pela adição de 2-propanol, observou-se que a retenção de todos os compostos diminuíram. Nessa coluna também foi possível separar os enantiômeros da PPF-5OH empregando etanol na fase móvel. Neste caso, a resolução foi obtida utilizando uma menor proporção de álcool que a reportada na **TABELA 13**.

A utilização de DEA à fase móvel permitiu a eluição de todos os compostos, o que não ocorria com a fase móvel isenta de dietilamina. Porém acima de 0,2 % não foi observada alteração significativa nos fatores de separação e retenção dos compostos, como observado na coluna CHIRALPAK AD[®]. Os mecanismos envolvidos são os mesmos discutidos anteriormente. A PPF e PPF-5OH foram resolvidas adequadamente, enquanto não houve resolução da PPF-NOR (**FIGURA 20**).

TABELA 13 Efeito da composição da fase móvel na retenção e na separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALCEL OD-H®

Composição da Fase Móvel	Parâmetros Cromatográficos					
	PPF		PPF-5OH		PPF-NOR	
	k	α	k	α	k	α
% de 2-propanol						
Hexano:2-propanol + dietilamina 0,1 %						
5	7,57	1,17	-	-	-	-
10	3,49	1,13	10,57	1,00	9,43	1,00
15	2,34	1,11	5,47	1,00	6,20	1,00
Tipo de Modificador Polar						
Hexano:álcool (90:10) + dietilamina 0,1 %						
2-propanol	3,49	1,13	10,57	1,00	9,43	1,00
etanol	1,98	1,00	5,50	1,05	5,47	1,00
% de Dietilamina						
Hexano:2-propanol (90:10) + dietilamina						
0	-	-	-	-	-	-
0,1	3,49	1,13	10,57	1,00	9,43	1,00
0,2	3,37	1,14	9,95	1,00	8,75	1,00
0,4	3,29	1,15	9,43	1,00	8,67	1,00
% de Ácido Trifluoroacético						
Hexano: 2-propanol (90:10) + ác. Trifluoroacético						
0	-	-	-	-	-	-
0,1	8,74	1,13	-	-	8,35	1,00
0,2	6,32	1,22	-	-	6,97	1,00
0,4	6,31	1,21	-	-	7,36	1,00

Vazão= 1,0 mL/min.; k=fator de retenção para o primeiro enantiômero eluído; α = fator de separação.

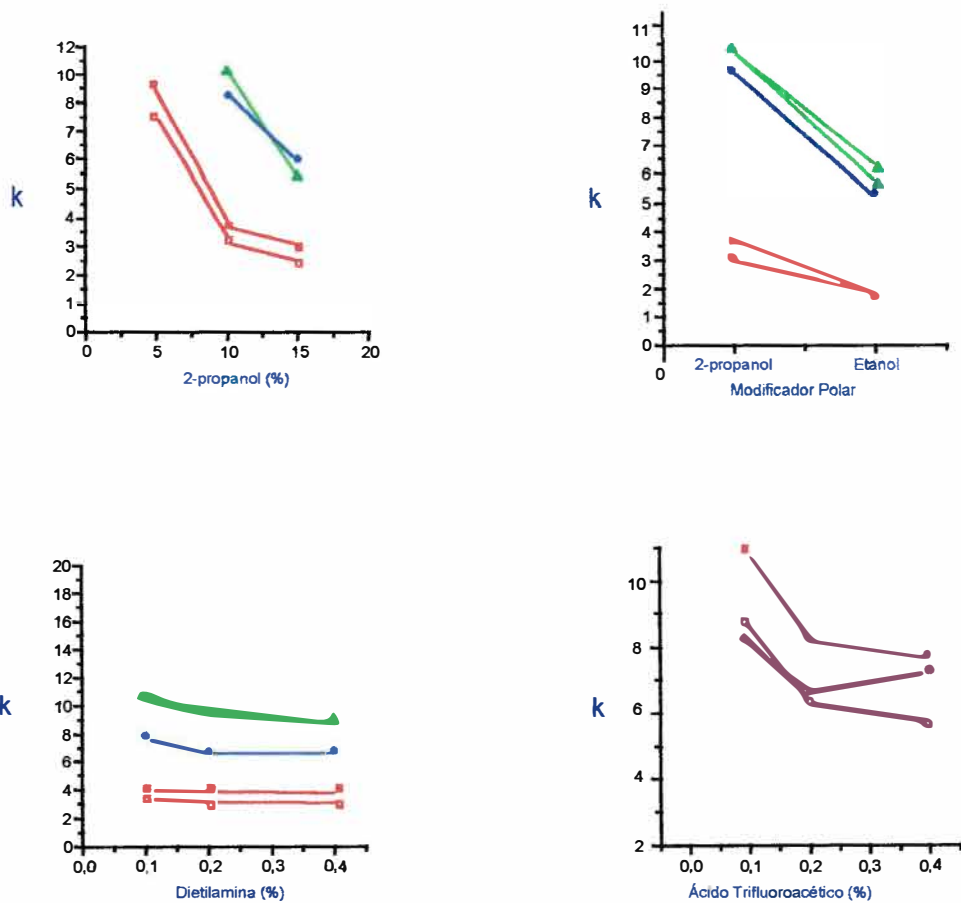


FIGURA 19 Efeito da composição da fase móvel nos fatores de retenção dos enantiômeros da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR na coluna CHIRALCEL OD-H®

□- (R)-PPF △- (R)-PPF-5OH ○- (R)-PPF-NOR
 ■- (S)-PPF ▲- (S)-PPF-5OH ●- (S)-PPF-NOR

Fases móveis descritas na Tabela 13.

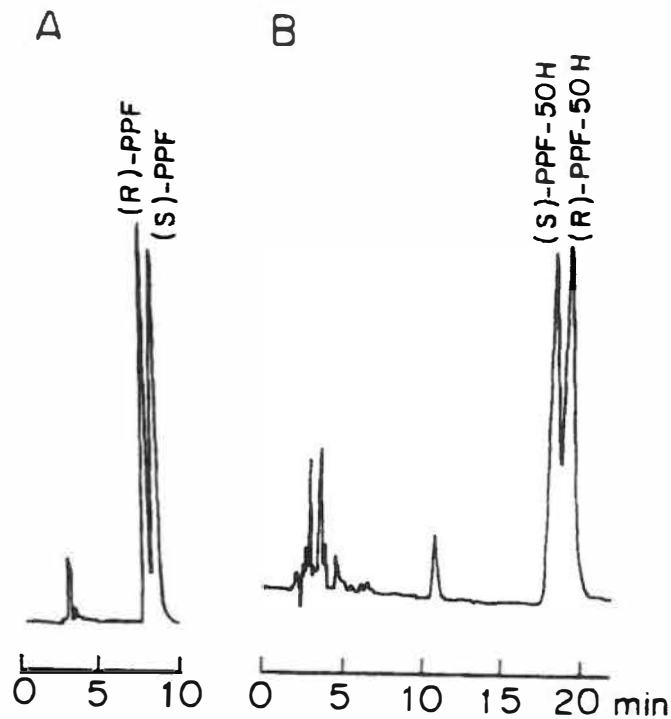


FIGURA 20 Resolução dos enantiômeros da (A)-PPF e (B)-PPF-5OH na coluna CHIRALCEL OD-H[®]

Fase móvel: (A)-hexano:2-propanol (90:10) + 0,1% de dietilamina; Vazão 1,0 mL/min. (B)-hexano:etanol (95:5) + 0,1% de dietilamina; Vazão 1,0 mL/min. Detecção: 300 nm.

4.2 Determinação da configuração absoluta e da ordem de eluição dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos

A monitorização das concentrações dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos em fluidos biológicos requer uma completa caracterização estereoquímica, isto é, a determinação do excesso enantiomérico e a configuração absoluta do enantiômero que prevalece no plasma (De Camp *apud* HOLLENHORST & BLASCHKE 1991). Em 1991 HOLLENHORST & BLASCHKE

designaram a configuração absoluta dos enantiômeros da PPF e desenvolveram procedimentos para separação do fármaco inalterado e dos metabólitos. Utilizando a coluna CHIRALPAK AD[®], e a fase móvel hexano:2-propanol:triethylamina, esses autores concluíram que a (R)-PPF eluiu primeiro. Este resultado foi recentemente confirmado por BHÖM *et al.* (1995), através da injeção dos enantiômeros isolados na coluna CHIRALPAK AD[®] utilizando hexano:2-propanol:dietilamina como fase móvel.

Sabendo a ordem de eluição da PPF na coluna CHIRALPAK AD[®] e a sua configuração absoluta, foi possível estabelecer também a ordem de eluição dos enantiômeros dos metabólitos da PPF, utilizando detecção por dicroísmo circular (DC). Esta parte do estudo foi realizada pelo Dr. Carlo Bertucci, no Centro di Studio per le Macromolecole Stereordinate ed Otticamente Attive-CNR do Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa.

A (R)-PPF, o primeiro enantiômero eluído na coluna CHIRALPAK AD[®] utilizando 2-propanol ou etanol na fase móvel, mostrou uma banda DC negativa em torno de 300 nm. Um sinal DC negativo na mesma faixa espectral foi observado também nos casos da PPF-NOR e PPF-5OH. Levando em conta a similaridade estrutural da PPF e de seus metabólitos, a configuração absoluta (R) pode ser sugerida para aquelas frações que mostraram sinais DC negativos em 300 nm. A mesma ordem de eluição, o enantiômero (S) sendo o mais retido, foi obtida para os três compostos analisados na coluna CHIRALPAK AD[®].

Uma vez estabelecida a ordem de eluição da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD[®], foi possível coletar frações correspondentes a cada um

deles e, a seguir, analisar essas frações nas outras colunas empregadas nesse estudo, utilizando as fases móveis discutidas nas **FIGURAS 12, 14, 16, 18, 20**. Através desses experimentos determinou-se a ordem de eluição da PPF, PPF-5OH e PPF-NOR nas demais colunas (**TABELA 14**).

TABELA 14 Ordem de eluição da PPF e de seus metabólitos

Coluna	PPF		PPF-NOR		PPF-5OH	
	1	2	1	2	1	2
Ultron ES OVM [®]	-	-	-	-	S	R
Chiral AGP [®]	S	R	S	R	-	-
Chiralcel ODR [®]	S	R	S	R	-	-
Chiralcel OD-H [®]	R	S	-	-	S	R
Chiralpak AD [®]	R	S	R	S	R	S

A ordem de eluição foi a mesma para a PPF e seus metabólitos em todas as colunas exceto para a PPF-5OH na coluna CHIRALCEL OD-H[®], onde se verificou uma inversão na ordem de eluição, isto é, a (R)-PPF elui primeiro na coluna, enquanto que para o seu metabólito observa-se ordem de eluição inversa.

4.3 Análise Enantiosseletiva da PPF e PPF-5OH em Plasma

A coluna CHIRALPAK AD[®] apresentou o melhor desempenho para a resolução dos enantiômeros da PPF e de seu metabólito PPF-5OH. A fase móvel mais adequada foi hexano-etanol (88:12, v/v), acrescida de 0,1% de dietilamina e

empregada na vazão de 1,3 mL/min. O comprimento de onda selecionado para detecção foi 315 nm e o volume de injeção foi 50 μ L.

Os compostos foram adicionados em 1 mL de plasma e submetidos ao procedimento de extração descrito na **FIGURA 8**.

A **FIGURA 21** ilustra a separação obtida juntamente com o branco de plasma, indicando a ausência de interferentes no intervalo de eluição dos enantiômeros da PPF e da PPF-5OH.

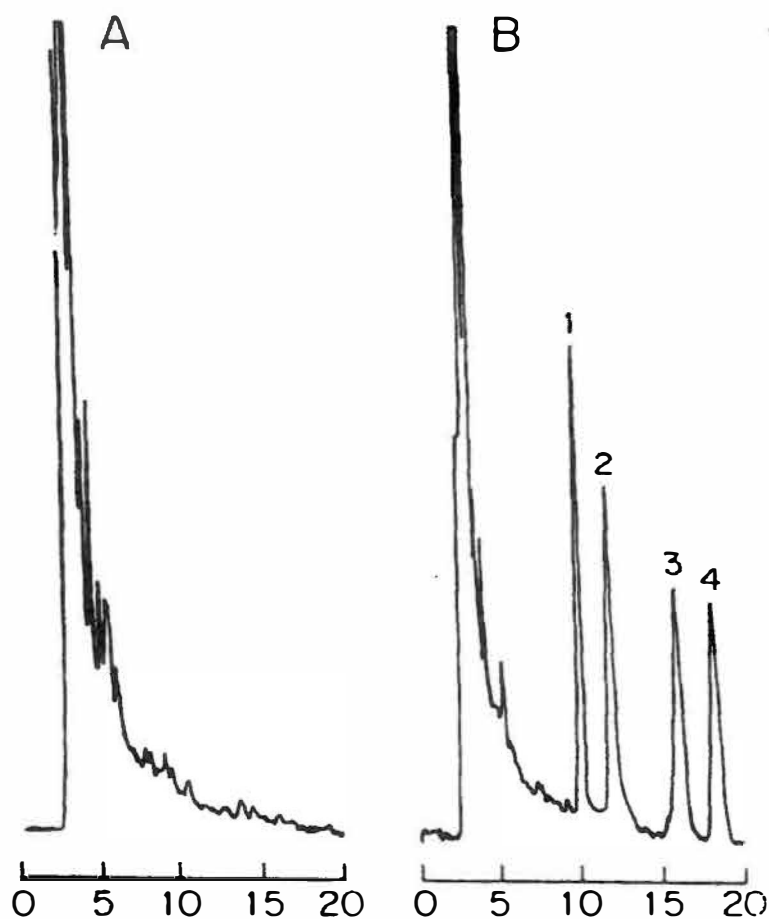


FIGURA 21 Cromatogramas indicando a resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH em plasma

Fase móvel: hexano-etanol (88:12) + 0,1% de dietilamina; vazão: 1,3 mL/min.; detecção: 315 nm. 1-(R)-PPF; 2-(R)-PPF-5OH; 3-(S)-PPF-5OH; 4-(S)-PPF

(A) - Branco de Plasma.

(B) - Plasma enriquecido com 10 μ g de PPF e PPF-5OH.

4.4 Validação do método e Análise Estatística.

A padronização interna é menos susceptível a erros técnicos e, portanto este procedimento foi inicialmente selecionado para a quantificação dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH em plasma. Este método consiste em comparar a relação entre a área obtida do composto que se deseja analisar e a do padrão interno. Adiciona-se uma quantidade conhecida do padrão interno às amostras contendo quantidades crescentes do composto a ser analisado e determina-se a relação entre as áreas ou alturas dos picos obtidos (BONATO, 1990).

A substância utilizada como padrão interno deve ser similar ao composto analisado, estar presente em concentrações similares, ter tempo de retenção próximo ao composto problema, sem causar interferência, ser inerte e não fazer parte da amostra (COLLINS, 1995). Assim, dentre os vários fármacos testados, o escolhido foi o metoprolol. Porém, devido a elevada concentração necessária para sua detecção, o uso deste fármaco levou a resultados insatisfatórios nos testes de validação.

Por isso, optou-se pelo método da padronização externa para a quantificação. A padronização externa consiste em comparar a área ou altura do pico correspondente a quantidades conhecidas do composto problema com a área ou altura do mesmo composto na amostra, cuja concentração se deseja determinar.

4.4.1 Recuperação

Os procedimentos de preparação da amostra levam a perdas do fármaco ou de seus metabólitos devido à extração incompleta, adsorção, perda do volume ou co-precipitação. Assim sendo, raramente o fármaco pode ser completamente recuperado a partir de amostras biológicas, mas essa perda poderá ser minimizada pela otimização das condições do procedimento de extração. A concentração do fármaco pode influenciar sua recuperação, portanto esta precisa ser avaliada na faixa de concentrações esperadas nas amostras. Um método reprodutível que não apresente recuperação satisfatória pode ser aceitável quando as amostras são analisadas com a calibração apropriada dos padrões. Entretanto, quando a recuperação do analito não é reprodutível, não podem ser obtidas boa repetibilidade e exatidão (McDOWALL, 1989).

Neste estudo, a recuperação foi avaliada através da construção de uma curva de calibração obtida pela injeção direta das soluções-padrão de PPF e PPF-5OH, após evaporação do solvente e dissolução dos resíduos na fase móvel. A seguir, amostras de plasma enriquecidas com PPF e PPF-5OH no intervalo de 25,0 a 500,0 ng/mL de cada enantiômero foram analisadas, em duplicata, após o procedimento de extração representado na **FIGURA 9**.

Na **TABELA 15** pode-se observar a reprodutibilidade do procedimento de extração e que a porcentagem de recuperação não depende da concentração dos fármacos no intervalo estudado.

TABELA 15 Resultados obtidos na avaliação da recuperação do método desenvolvido

	Concentração Plasmática (ng/mL)	Recuperação (%)	C.V. (%)
(R)-PPF	25,0	66,27	7,10
	125,0	60,49	6,23
	250,0	60,25	6,58
	500,0	64,68	5,38
(S)-PPF	25,0	60,86	8,32
	125,0	59,65	7,63
	250,0	57,35	7,16
	500,0	67,37	5,87
(R)-PPF-5OH	25,0	59,05	5,02
	125,0	54,77	4,86
	250,0	59,05	4,53
	500,0	57,70	4,64
(S)-PPF-5OH	25,0	57,14	6,21
	125,0	53,48	5,97
	250,0	57,06	5,25
	500,0	58,33	4,70

4.4.2 Curva de Calibração

Toda análise quantitativa necessita de uma curva de calibração cuidadosamente elaborada, pois dela depende a confiabilidade do método. No caso da análise de fármacos em amostras de origem biológica, a curva calibração é preparada enriquecendo alíquotas da amostra que não contém o fármaco com quantidades exatamente medidas do fármaco de elevada pureza (padrão de referência).

A curva de calibração consiste em verificar se uma relação de primeira ordem (linear) é observada entre a resposta do detetor (y) e a concentração (x) da substância, podendo ser descrita pela equação linear: $y = ax + b$, onde (a) é a inclinação da reta e (b) é a intercessão da reta com o eixo das ordenadas do gráfico da curva de calibração. Idealmente, (a) deve ser reprodutível e (b) não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve apresentar ainda um alto coeficiente de correlação ($r > 0,99$). O valor ideal para o coeficiente de correlação é um, mas ele é afetado pela faixa e distribuição das concentrações utilizadas na calibração (LANG & BOLTON, 1991 a,b).

Os valores obtidos para a curva de calibração, demonstrados na **FIGURA 22**, indicam linearidade satisfatória e um elevado coeficiente de correlação.

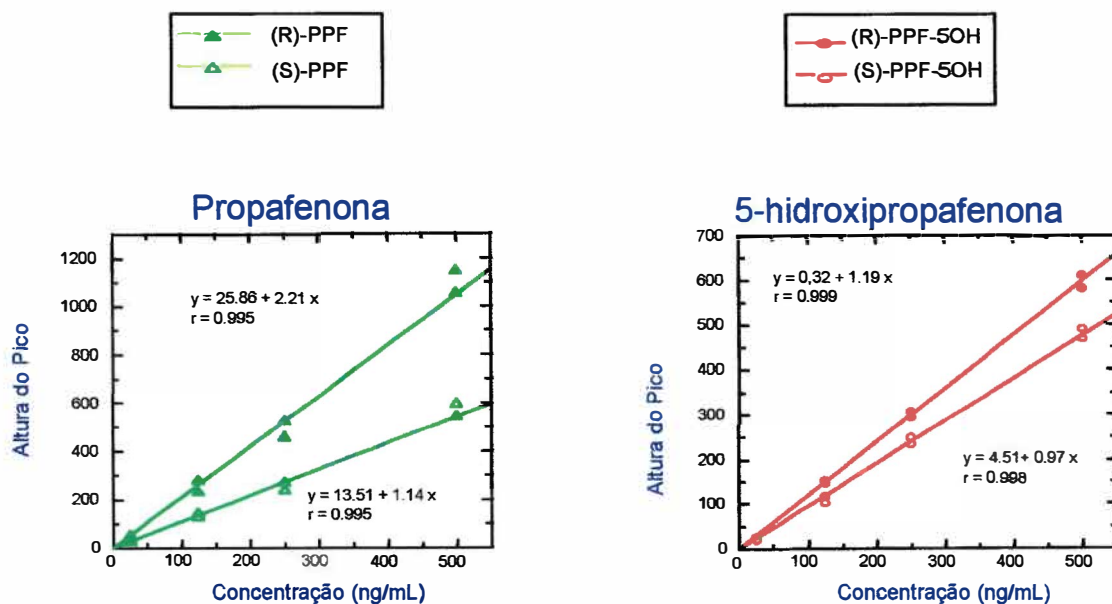


FIGURA 22 Curva de Calibração para análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH

4.4.3 Linearidade

A avaliação da linearidade do método é feita de forma idêntica a usada para obtenção da curva de calibração, exceto pela ampliação do intervalo de concentrações plasmáticas.

O intervalo de concentração utilizado para o ensaio de linearidade foi de 25 a 1250 ng/mL, este intervalo foi selecionado pois é condizente com a faixa de concentração utilizada em estudos de disposição cinética (HOLLENHORST & BLASCHKE, 1991). O tratamento estatístico da curva de calibração envolveu a determinação da equação da regressão linear e do coeficiente de correlação. Os valores obtidos para avaliação da linearidade, a exemplo da curva de calibração, também se revelaram bastante satisfatórios como demonstra a **FIGURA 23**.

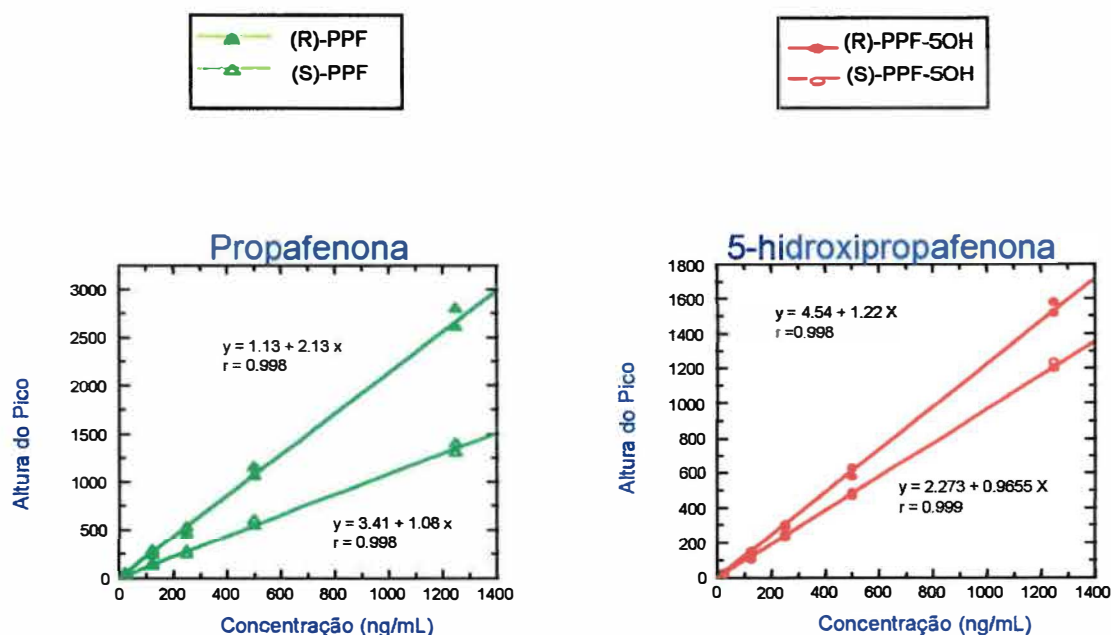


FIGURA 23 Avaliação da linearidade do método desenvolvido para análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH

4.4.4 Repetibilidade e exatidão

A confiabilidade de um método pode ser avaliada através dos ensaios de repetibilidade e exatidão que determinam o erro da análise. A repetibilidade e exatidão são normalmente determinadas pela análise de replicatas de amostras-controle em várias concentrações, preferencialmente duas ou mais, dentro da faixa de concentração esperada para as amostras (CAUSON, 1997). Quando a análise das amostras-controle são realizadas no mesmo ensaio ou no mesmo dia, os dados de repetibilidade e exatidão são expressos como repetibilidade ou exatidão intra-ensaio, enquanto que a repetibilidade e exatidão interensaios referem-se às análises realizadas em dias diferentes (PENG & CHIOU, 1990). A repetibilidade avalia a variação dos resultados quando repetidas análises são feitas em uma mesma amostra. O valor numérico usado é o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (CHASIN *et al.*, 1994):

$$CV (\%) = S \times 100 / \bar{x}$$

sendo,

S = estimativa do desvio padrão

\bar{x} = média das medidas

A exatidão relativa indica a proximidade entre o valor real da substância na amostra e o valor estimado pelo processo analítico. É expressa em porcentagem do erro sistemático, podendo ser calculada pela fórmula (QUATTROCCHI *et al.*, 1992 b):

$$E (\%) = (v_o - v_R / v_R) . 100$$

sendo,

v_R = valor real,

v_O = valor obtido.

Alguns autores consideram que os ensaios realizados na análise de amostras biológicas para estudos farmacocinéticos não devem apresentar erro maior que 10 %. Contudo, outros autores consideram aceitáveis valores de até 20%, quando as concentrações são reduzidas (SHAH *et al.*, 1992; PENG & CHIOU, 1990).

Neste estudo, a repetibilidade e a exatidão foram avaliadas através dos testes intra e interensaios, para três amostras com diferentes concentrações de PPF e PPF-5OH. Foram preparadas amostras de plasma branco adicionadas de 50, 200 e 1000 ng/mL de cada enantiômero.

Na repetibilidade e exatidão intra-ensaio foram analisadas dez amostras (n=10) de um mesmo lote, já na repetibilidade e exatidão interensaios foram considerados os resultados das análises de cinco diferentes lotes, realizados em cinco dias diferentes, em duplicatas para cada concentração.

As **TABELAS 16 e 17** mostram os resultados obtidos, onde verifica-se que os coeficientes de variação não ultrapassaram o limite de 10%.

4.4.5 Limite de Quantificação

Nesse estudo, foi considerada como sendo o limite de quantificação, ou seja, a menor concentração quantificada com erro inferior a 10%.

TABELA 16 Resultados da avaliação da repetibilidade e exatidão interensaios

Concentração Real	Concentração Obtida (ng/mL)	Repetibilidade (%CV)	Exatidão (Erro %)
50 ng/mL			
(R)-PPF	52,35	5,4	4,6
(S)-PPF	50,90	9,6	1,8
(R)-PPF-5OH	50,05	8,2	0,2
(S)-PPF-5OH	48,97	8,5	-2,2
200 ng/mL			
(R)-PPF	204,83	6,9	2,4
(S)-PPF	207,70	6,8	3,8
(R)-PPF-5OH	198,63	7,5	-0,7
(S)-PPF-5OH	205,36	6,4	2,7
1000 ng/mL			
(R)-PPF	964,55	6,1	-3,7
(S)-PPF	972,88	6,0	-2,8
(R)-PPF-5OH	968,85	2,1	-3,2
(S)-PPF-5OH	968,98	5,8	-3,2

* (n=5)

TABELA 17 Resultados da avaliação da repetibilidade e exatidão intra-ensaio

Concentração Real	Concentração Obtida (ng/mL)	Repetibilidade (%CV)	Exatidão (Erro %)
50 ng/mL			
(R)-PPF	52,55	5,9	5,0
(S)-PPF	52,17	6,4	5,0
(R)-PPF-5OH	47,63	8,5	-4,4
(S)-PPF-5OH	49,37	7,3	-1,2
200 ng/mL			
(R)-PPF	198,39	7,5	-0,8
(S)-PPF	198,79	7,0	-0,6
(R)-PPF-5OH	195,32	8,2	-2,3
(S)-PPF-5OH	197,07	5,8	-1,4
1000 ng/mL			
(R)-PPF	1032,40	6,5	3,1
(S)-PPF	1046,76	2,5	4,5
(R)-PPF-5OH	1041,44	4,8	3,9
(S)-PPF-5OH	1035,21	6,9	3,4

* (n=10)

O limite de quantificação é dependente das condições de análise tal como a temperatura, pureza dos reagentes, matriz da amostra e sistema instrumental (BRESSOLLE *et al.*, 1996).

Para determinação do limite de quantificação, foi analisada uma amostra enriquecida com 12,5 ng/mL de cada enantiômero da PPF e PPF-5OH. Porém, os resultados de repetibilidade e exatidão obtidos na análise dessas amostras apresentaram erros superiores a 10%. Portanto, o limite de quantificação considerado foi o menor ponto das curvas de calibração, ou seja, 25 ng/mL de cada enantiômero em plasma (SHAH *et al.*, 1992).

4.4.6 Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade do método em produzir um sinal devido exclusivamente à substância em estudo e livre da interferência de outros componentes na matriz da amostra. Para análise de fármacos em fluidos biológicos, estes compostos podem ser seus metabólitos, substâncias endógenas ou ainda outros fármacos administrados em associação (BOTSCH *et al.*, 1992).

Neste estudo, a seletividade foi avaliada através da análise de diversos fármacos com possibilidade de apresentar interferência no método desenvolvido, verificando-se a coincidência dos tempos de retenção com os enantiômeros da PPF e PPF-5OH.

Na **TABELA 18** estão relacionados os fármacos testados, onde somente os que apresentaram picos com tempos de retenção coincidentes com os dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH foram submetidos ao procedimento de

TABELA 18 Fármacos avaliados como interferentes do método desenvolvido (JACKSON, 1986; LIMA, 1994)*

Fármaco	Concentração Plasmática terapêutica ($\mu\text{g/mL}$)*	Tempo de retenção (min.)
ANTICONVULSIVANTES:		
Fenitoína	20,0	5,2
Carbamazepina	14,0	14,1
Fenobarbital	30,0	ND
Ácido Valpróico	100,0	5,0
CARDIOVASCULARES:		
Propranolol	1,0	4,5 e 5,2
Metoprolol	0,2	6,1 e 7,8
Salbutamol	0,12	ND
Atenolol	0,87	ND
Pindolol	0,08	5,85
Verapamil	0,068	ND
Mexiletina	0,5	ND
Disopirâmida	7,5	5,0 e 5,7
Amiodarona	1,0	3,5 e 4,9
Procainamida	10,0	10,1
Lidocaína	5,0	19,8 e 22,3
ANALGÉSICOS:		
Ácido acetilsalicílico	300,0	ND
Acetaminofeno	20,0	ND
Propoxifeno	0,4	6,3
Dipirona	11,0	19,2
ANTIDEPRESSIVOS:		
Amitrípilina	0,25	8,0
Imipramina	0,25	3,2
BENZODIAZEPÍNICOS:		
Diazepam	2,5	12,6
Clonazepam	0,024	16,7
Alprazolam	0,020	ND
Triazolam	0,017	5,8
Bromazepam	0,17	15,7
Flunitrazepam	0,02	24,5
Flurazepam	0,03	25,3
Lorazepam	0,24	18,6
OUTROS:		
Cimetidina	1,5	12,3 e 13,9
Dexametasona	0,1	ND
Albendazol	1,0	13,3
Albendazol sulfóxido	2,0	6,2
Albendazol sulfona	1,0	14,6
Mebendazol	0,12	6,2

Tempos de Retenção: (R)-PPF 10,0 min; (S)-PPF 12,0 min;

(R)-PPF-5OH 16,2 min; (S)-PPF-5OH 18,0 min

extração. A PPF-NOR não foi detectada nas condições de análise utilizadas e, portanto, também não interfere na análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH. Dos outros fármacos analisados, apenas a procainamida, a cimetidina, o lorazepam e o clonazepam interferem na determinação enantiosseletiva da PPF e de seu metabólito em plasma.

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado para análise dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH foi empregado para análise de uma amostra obtida de um voluntário sadio, após administração de PPF na forma de racemato. A análise dessa amostra tem por finalidade ilustrar a aplicabilidade do método.

A **FIGURA 24** mostra o cromatograma resultante dessa análise, onde verifica-se que o resultado obtido confirma a disposição cinética estereosseletiva da PPF proposta por Kroemer *et al.*, havendo predominância do enantiômero (S)-PPF no plasma. O produto da metabolização da (S)-PPF, ou seja, (S)-PPF-5OH não foi detectado.

Segundo os autores, a eliminação do enantiômero (S)-PPF é consideravelmente reduzido quando a PPF é administrada como uma mistura racêmica, resultando num aumento significativo das concentrações plasmáticas da (S)-PPF e aumento na sua meia-vida de eliminação. Isto ocorre porque a metabolização do isômero (S)-PPF é inibida pelo enantiômero (R)-PPF de

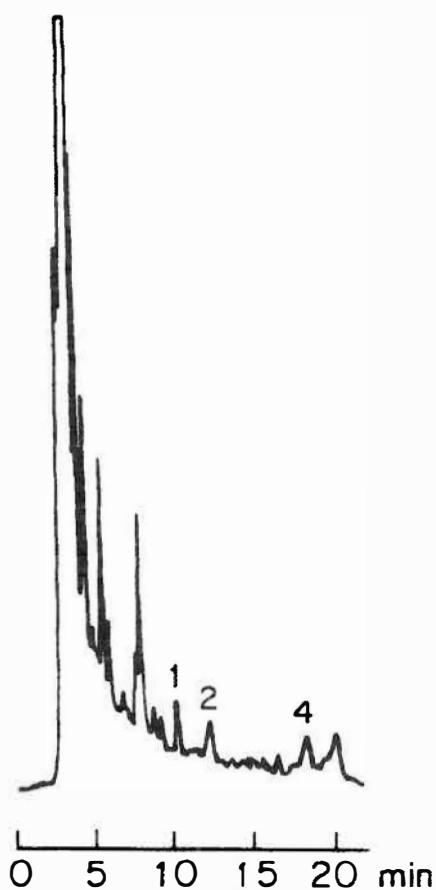


FIGURA 24 Cromatograma indicando a resolução da dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH na amostra obtida de um voluntário, na coluna CHIRALPAK AD[®] 1-(R)-PPF; 2-(R)-PPF-5OH; 4-(S)-PPF.

Fase móvel: hexano-etanol, (88:12) + 0,1% de dietilamina; vazão 1,3 mL/min; detecção 300 nm.

maneira competitiva. Uma vez que a atividade β -adrenérgica está relacionada principalmente ao enantiômero (S)-PPF, a inibição de seu metabolismo pode ter implicações clínicas (KROEMER *et al.*, 1991; KROEMER *et al.*, 1994).

4.6 COMENTÁRIOS FINAIS

A análise dos enantiômeros da PPF em plasma tem sido realizada através de métodos cromatográficos, porém, para que haja a discriminação dos enantiômeros torna-se necessária a criação de um ambiente assimétrico. Para isso pode-se utilizar colunas contendo fases estacionárias quirais, aditivos quirais podem ser adicionados à fase móvel, ou ainda, pode-se realizar a formação de diastereoisômeros através de reações de derivação com reagentes quirais enantiomericamente puros (DÄPPEN, 1986). Estudos realizados com esses três procedimentos podem ser encontrados na literatura.

Os métodos baseados na derivação quiral (MEHVAR, 1990; KROEMER *et al.*, 1989) apresentam como principal desvantagem, a possibilidade de racemização do reagente quiral durante a reação ou estocagem. Além disso, o método descrito por KROEMER *et al.* (1989) é pouco sensível, já que apresenta limite de quantificação de 100 ng de cada enantiômero da PPF por mL de plasma.

Os métodos baseados na adição de um aditivo quiral à fase móvel (KERN, 1994; ABOUL-ENEIN & BARK, 1993) também apresentaram a desvantagem de racemização do reagente durante a estocagem e, além disso, o custo da análise é elevado devido ao seu grande consumo. No entanto, ressalta-se que o método descrito por KERN (1994) é o único que possibilita não só a quantificação dos enantiômeros da PPF, como também da PPF-5OH. Pelos motivos descritos acima o interesse atual está dirigido para o emprego de fases estacionárias

quirais. A **TABELA 19** reúne as principais informações e características dos métodos baseados em fases estacionárias quirais discutidos na literatura e do método descrito nesse estudo.

TABELA 19 Comparação dos métodos baseados em fases estacionárias quirais

Método	Composto	Extração	Coluna	Linearidade	Recuperação		L.Q.	
				(ng/mL)	(%)		(ng/mL)	
				(R)/(S)	(R)	(S)	(R)	(S)
1	PPF	ELL	CHIRALPAK AD [®]	-	-	-	-	-
2	PPF	ELL	CHIRALPAK AD [®]	5-400	95,0	82,0	10	10
3	PPF	ELL	CHIRALCEL OD [®]	-	-	-	-	-
4	PPF	ELS	CHIRALCEL ODR [®]	25-2500	100,5	99,9	25	25
5	PPF	ELL	CHIRALPAK AD [®]	25-1250	62,9	61,3	25	25
5	PPF-5OH	ELL	CHIRALPAK AD [®]	25-1250	57,6	56,5	25	25

*ELL=Extração Líquido-Líquido; ELS=Extração Líquido-Sólido; L.Q.=Limite de quantificação.

1-HOLLENHORST & BLASCHKE, 1991; 2-BHÖM *et al.*, 1995; 3-ABOUL-ENEIN & BARK, 1993; 4-GAETANI *et al.*, 1998; 5-ABREU *et al.*, 1998.

Analisando a **TABELA 19** verifica-se que os únicos dois métodos validados descritos na literatura (BHÖM *et al.*, 1995 e De GAETANI *et al.*, 1998) reportam melhores rendimentos de recuperação, porém realizam apenas a análise enantiosseletiva da PPF e não de seu principal metabólito. Para a resolução simultânea da PPF e PPF-5OH foi necessária a remoção total dos interferentes endógenos que causavam interferência na análise, o que resultou num maior número de passos no procedimento de extração e, conseqüentemente, num menor rendimento de extração. Sendo assim, apesar de apresentar um menor rendimento de extração, o método descrito nesse estudo é superior aos demais métodos descritos na literatura, pois possibilita a resolução simultânea dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH, nas mesmas condições de análise. O limite

de quantificação de 25 ng/mL permite que o método seja empregado em estudos de disposição cinética de dose múltipla. (KROEMER *et al.*, 1994).

Não foi possível realizar a resolução da PPF e de seus metabólitos na coluna CHIRALPAK AD[®] pois a NOR-PPF apresentou assimetria em seus picos, o que provoca a sobreposição dos picos dos compostos analisados (FIGURA 25).

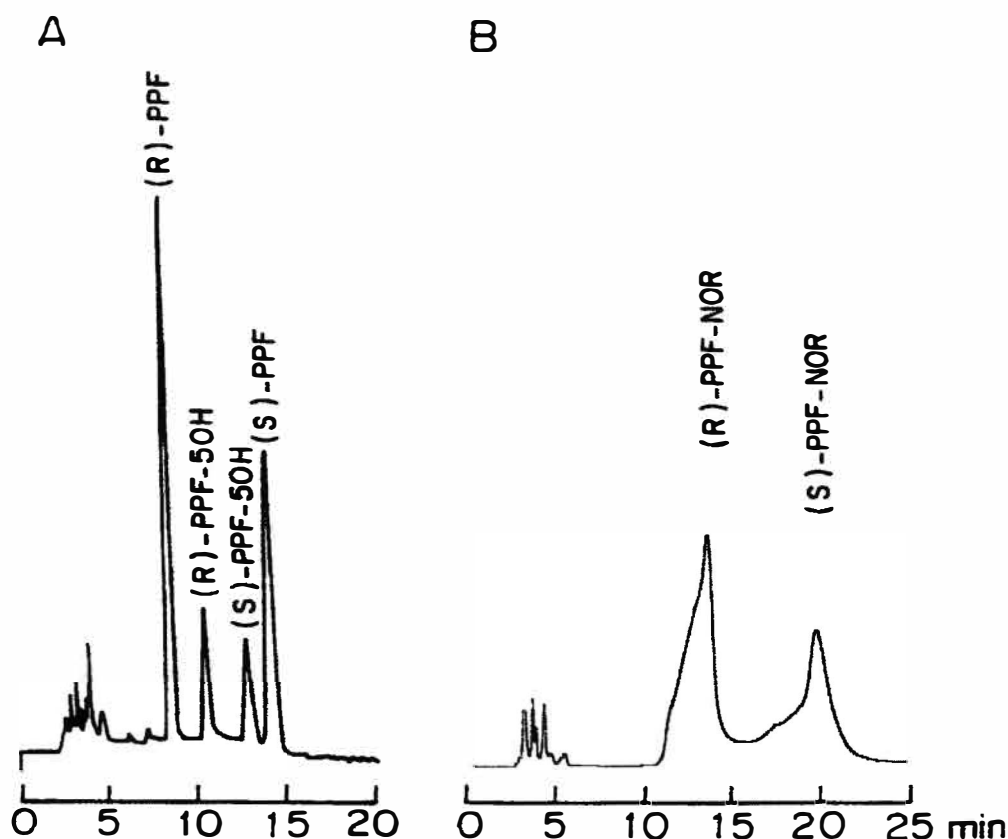


FIGURA 25 Resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH (A) e PPF-NOR (B) na coluna CHIRALPAK AD[®]

Fase móvel: hexano:etanol (88:12) + 0,1% de dietilamina; Vazão 1,3 mL/min. Detecção: 300 nm.

No entanto, destaca-se que a NOR-PPF não interfere na determinação dos enantiômeros da PPF e PPF-5OH no plasma visto que este metabólito não é extraído pelo procedimento proposto.

Conclusões

Através da análise dos dados obtidos na avaliação das colunas quirais pode-se concluir que em nenhuma das colunas avaliadas foi obtida a separação dos enantiômeros da PPF e de seus metabólitos nas mesmas condições de análise. A coluna CHIRALPAK AD[®] foi, dentre as colunas testadas, a que apresentou os resultados mais promissores por ter sido a única coluna que resolveu os enantiômeros da PPF e PPF-5OH nas mesmas condições de análise e também por haver uma possibilidade de resolver os enantiômeros da PPF-NOR, apesar dos picos apresentarem certa assimetria. A fase móvel mais adequada para a resolução da PPF e de seu principal metabólito PPF-5OH foi hexano-etanol (88:12, v/v), acrescida de 0,1% de dietilamina, na vazão de 1,3 mL/min. Os fármacos analisados apresentaram comportamento similar na coluna CHIRALCEL OD-H[®], exceto para PPF-NOR, cujos enantiômeros não foram separados com nenhuma das fases móveis empregadas.

Entre as colunas baseadas em proteína, a coluna ULTRON ES-OVM[®] apresentou boa resolução apenas para os enantiômeros da PPF-5OH, utilizando a fase móvel tampão acetato 20 mmol/L, pH 3,5:acetonitrila (97:3). A coluna Chiral AGP[®] não separou os enantiômeros da PPF-5OH; as fases móveis mais indicadas para a resolução dos enantiômeros da PPF e PPF-NOR foram tampão fosfato 10 mmol/L, pH 5,5:1-propanol (92:8) e tampão fosfato 100 mmol/L, pH 5,5:metanol (98:2), respectivamente.

Finalmente, para a coluna Chiralcel OD-R[®], observou-se a resolução dos enantiômeros da PPF-NOR com a fase móvel perclorato de sódio 0,25 mol/L, pH 5,5:acetonitrila (70:30) e PPF com a fase móvel perclorato de sódio 0,25 mol/L, pH 4,0:acetonitrila (60:40).

Com base nesses resultados, a coluna CHIRALPAK AD[®] foi selecionada para ser empregada no desenvolvimento de um método para análise enantiosseletiva da PPF e PPF-5OH em plasma.

O método desenvolvido para análise dos enantiômeros da PPF e de seu principal metabólito pode ser considerado adequado, uma vez que os parâmetros cromatográficos otimizados forneceram resultados de validação aceitáveis e bastante satisfatórios. A partir da análise dos dados obtidos no procedimento de validação do método desenvolvido, verifica-se que este foi linear na faixa de 25 a 1250 ng/mL, apresentando repetibilidade e exatidão com desvios abaixo de 10% e recuperação em torno de 60%. O limite de quantificação obtido foi de 25 ng/mL e o método mostrou-se bastante seletivo, uma vez que poucos fármacos revelaram-se como interferentes.

***Referências
Bibliográficas***

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; BAKR, S. S. (1993). Direct enantiomeric high performance liquid chromatographic separation of propafenone and its major metabolite in serum on a cellulose tris-3,5-dimethylphenyl carbamate chiral stationary phase. Biomed. Chromatogr. , v.7, n.1, p.38-40.
- ABREU, L. R. P.; LANCHOTE, V.L.; BERTUCCI, C.; CESARINO, E. J.; BONATO, P.S. (1995). Simultaneous determination of propafenone and 5-hydroxypropafenone enantiomers in plasma by high performance liquid chromatography on a amylose derived chiral stationary phase. J. Pharm. Biomed. Anal.
- ALLENMARK, S. (1989). Protein-bonded phases. In: KRSTULOVIC, A.M. (ed.). Chiral Separations by HPLC, Chichester, Ellis Harwaad, cap.11, 287-315.
- ALLENMARK, S.G.; ANDERSSON, S. (1994). Proteins and peptides as chiral selectores in liquid chromatography. J. Chromatogr. A, v.666, p.167-79.
- ARVIDSSON, E.; JANSSON, S. O. (1992). Retention processes on α_1 -glycoprotein-bonded stationary phase. J. Chromatogr., v.591, n 1-2, p.55-63.
- BARGMANN-LEYDER, N.; TAMBUTÉ, A.; CAUDE, M. (1995). A comparison of LC and SFC for cellulose- and amylose-derived chiral stationary phases. Chirality, v.7, p.311-25.
- BIRGERSDOTTER-GREEN, U. (1992). Propafenone for cardiac arrhythmias. Am.J.Med. Sci., v.303, p.123-8.
- BÖHM, R.; ELLRICH, R.; KOYTCHEV, R. (1995). Quantification of R- and S-propafenone and of the main metabolite in plasma. Pharmazie, v.50, n.8, p.542-5.

- BONATO, P.S. (1995). Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 6. ed. Campinas, Editora da Unicamp. Cap.8, p.141-80.
- BOTSCH, S.; GAUTIER, J. C.; BEAUNE, P.; EICHELBAUM, M.; KROEMER, H.K. (1992). Identification and characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in n-dealkylation of propafenone: molecular base for interaction potencial and variable disposition of active metabolites. Mol. Pharmacol., v.43, n.1, p.120-6.
- BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. (1996). Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., v.686, n.1, p.3-10.
- CAMILLERI, P. (1991). Biomedical applications of chiral liquid chromatography. Biomed. Chromatogr., v.5, n.3, p.128-32.
- CAUSON, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., v.689, n.1, p.175-80.
- CHASIN, A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. (1994). Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. Rev. Farm. Bioquim. USP, v. 30, n.2, p.41-6.
- CHIRAL TECHNOLOGIES (1995). Chiralpak AD[®] instruction sheet. Chiral Technologies, inc. Exton, p.1.
- CHIRAL TECHNOLOGIES (1993). Chiralcel OD-H[®] instruction sheet. Chiral Technologies, inc. Exton, p.1.
- CHIRAL TECHNOLOGIES (1994). Chiralcel ODR[®] instruction sheet. Chiral Technologies, inc. Exton, p.1.

- CHROM TECH (1993). Chiral AGP[®] instruction manual. Chrom Tech AB. Hägersten, p.1-30.
- COLLINS, C.H. (1995). Princípios básicos da cromatografia. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 6. ed.; Campinas, Editora da UNICAMP, cap. 1, p. 11-26.
- DALGLIESH, C. E. (1951). The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. J. Chem. Soc. (Lond.), p.3940-2.
- DÄPPEN, R.; ARM, H.; MEYER, V. R. (1986). Applications and limitations of commercially available chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., v.373, n.1, p.1-20.
- De CAMP, W. H. (1989). The FDA perspective on the development of stereoisomers. Chirality, v.1, n.1, p.2-6.
- De GAITANI, C. M.; LANCHOTE, V. L.; BONATO, P. S. (1998). Enantioselective analysis of propafenone in plasma using a polysaccharide-based chiral stationary phase under reversed-phase conditions. J. Chromatogr. B., v. 708, p. 177-83.
- ELIEL, E. (1997). Infelicitous stereochemical nomenclature. Chirality, v.9, n.5, p.428-30.
- ENQUIST, M.; HERMANSSON, J. (1990). Separation of the enantiomers of β -receptor blocking agents and other cationic drugs using a CHIRAL AGP column. J. Chromatogr., v.519, 285-298.
- GILLIS, A. M.; YEE, YIN-GAIL; KATES, R. E. (1995). Binding of antiarrhythmic drugs to purified human α_1 -acid glycoprotein. Biomed. Pharmacol., v.34, n.24, p.4279-82.

- GÜBITZ, G. (1990). Separation of drug enantiomers by HPLC using chiral stationary phases - a selective review. Chromatographia, v.30, n.9/10, p.555-63.
- HAEFELI, W.E.; VOZEH, S.; HA, H.R.; TAESCHNER, W.; FOLLATH, F. (1991). Concentration-effect relations of 5-hydroxypropafenone in normal subjects. Am. J. Cardiol., v.67, n.11, p.1022-26.
- HAN, S. M.; ARMSTRONG, D. W. (1989). HPLC separation of enantiomers and others isomers with cyclodextrin-bonded phases: rules for chiral recognition. In: KRSTULOVIC, A. M. (ed.). Chiral separations by HPLC. Chichester, Ellis Harwood, cap.10, p.208-87.
- HERMANSSON, J. (1984). Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α_1 -acid glucoprotein as the chiral stationary phase. J.Chromatogr., v.269, 67-78.
- HOLLENHORST, TH.; BLASCHKE, G. (1991). Direct separation of the enantiomers of propafenone, diprafenone and their major metabolites by high-performance liquid chromatography on modified cellulose and amylose chiral stationary phases. J Chromatogr., v.585, n.2, p. 329-32.
- HYNECK, M.; DENT, J.; HOOK, J. B. (1990). Chirality: pharmacological action and drug development. In: BROWN, C. (ed.) Chirality in drug design and synthesis. London, Academic Press, cap.1, p.1-23.
- ISHIKAWA, A.; SHIBATA, T. (1993). Cellulosic chiral stationary phase under reversed-phase condition. J. Liq. Chromatogr., v.16, n.4, p.859-78.
- JACKSON, J.V.; BOSS, M.S.; WIDDOP, B. (1986). Clark's isolation and identification of drugs. 2. ed. London, Pharmaceutical Press.
- KAUFFMAN, J.B.; MYERS, R.D. (1975). The resolution of racemic acid. J. Chem. Educ., v.52, n.12.

- KERN, R. (1994). Internally standardized simultaneous assay of propafenone and 5-hydroxypropafenone enantiomers in human plasma by means of high performance liquid chromatography. Meth.Find.Exp.Clin.Pharmacol., v.16, p.203-10.
- KIRKLAND, K. M.; NEILSON, K. L.; McCOMBS, D. A. (1991). Comparison of a new ovomucoid and a second-generation α_1 -acid glycoprotein-based chiral column for the direct high-performance liquid chromatography resolution of drugs enantiomers. J. Chromatogr., v.545, p.43-58.
- KROEMER, H. K.; FISCHER, C.; MEESE, C. O.; EICHELBAUM, M. (1991). Enantiomer/enantiomer interaction of (S)- and (R)- propafenone for cytochromo P450IID6-catalized 5-hydroxylation: *in vitro* evaluation of the mechanism. Mol. Pharmacol., v.40, n.1, p.135-42.
- KROEMER, H. K.; FROMM, M. F.; BÜHL, K.; TEREFE, H.; BLASCHKE, G.; EICHELBAUM, M. (1994). An enantiomer-enantiomer interaction of (S)- and (R)- propafenone modifies the effect of racemic drug therapy. Circulation, v.89, n.5, p.2396-400.
- KROEMER, H. K.; FUNCK-BRENTANO, C.; SILBERSTEIN, D.; WOOD, A. J. J.; EICHELBAUM, M.; WOOSLEY, R. L.; RODEN, D. M. (1989). Stereoselective disposition and pharmacologic activity of propafenone enantiomers. Circulation, v.79, n.5, p.1068-76.
- KUNATH, A.; THEIL, F.; JÄHNISCH, K. (1996). Influence of the kind of the alcoholic modifier on chiral separation on a CHIRALPAK AD column. J. Chromatogr., v. 728, p. 249-57.
- LANG, J.R.; BOLTON, S. (1991). A comprehensive method validation estrategy for bioanalytical applications in the phamaceutical industry - a. Statistical analyses. J. Pharm. Biom. Anal., v.9, n.5, p.357-61.

- LANG, J.R.; BOLTON, S. (1991). A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry - b. Experimental considerations. J. Pharm. Biom. Anal., v.9, n.6, p.435 - 42.
- LEDDA, F.; MANTELLI, L.; MANZINI, S.; AMERINI, S.; MUGELLI, A. (1983). Electrophysiological and antiarrhythmic properties of propafenone in isolated cardiac preparations. J. Cardiovasc. Pharmacol., v. 3, p.1162-73.
- LEDERER, M. (1986). Applications and limitations of commercially available chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. J.Chromatogr., v.373, p.1-20.
- LEE, J.T.; KROEMER, H.K.; SILBERSTEIN, D.J.; FUNCK-BRENTANO, C.; LINEBERRY, M.D.; WOOD, A.J.; RODEN, D.M.; WOOSLEY, R.L. (1990). The role of genetically determined polymorphic drug metabolism in the beta-blockade produced by propafenone. N.Engl.J.Med., v.322, n.25, p.1764-8.
- LENNARD, M. S. (1991). Clinical pharmacology through the looking glass: reflections on the racemate vs enantiomer debate. Br.J. Pharmacol., v.31, n.6, p.623-5.
- LIMA, D.R. (1994). Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxicologia. 2 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- LINDNER, W. (1991). Enantioselective chromatography: selection of chiral recognition models. Mikrochim. Acta, v.2, p.113-28.
- MALFATTO, G.; ZAZA, A.; FORSTER, M.; SODOWICK, B.; DANILO JR., P.; ROSEN, M.R. (1988). Electrophysiologic, inotropic and arrhythmic effects of propafenone, 5-hydroxypropafenone and n-depropylpropafenone. J. Pharmacol. Exp. Ther., v.246, n.2, 419-26.

- MARTINS, J. M. M.; FARINHA, A. R.; MORAIS, J. A. (1991). Separação e análise de enantiômeros de fármacos por HPLC. Rev. Port. Farm., v.41, n.1, p.14-20.
- MARZO, A. (1993). How incoming guidelines on chiral drugs could impact on the international scenery of drug development. Boll. Chim. Farm., v.132, n.8, p.267-71.
- McDOWALL, R. D. (1989). Sample preparation for biomedical analysis. J. Chromatogr., v.492, p.3-58.
- MEHVAR, R. (1990). Liquid chromatographic analysis of propafenone enantiomers in human plasma. J. Chromatogr., v.527, n.1, p.79-89.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. (1990). Química orgânica. 9.ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, cap.4, p.152-204: Estereoquímica.
- OKAMOTO, Y; KAIDA, Y. (1994). Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. J. Chromatogr. A, v.666, p.403-19.
- OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K. (1986). Chromatographic resolution - XI. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel. J. Chromatogr., v.363, p.173-86.
- PENG, G. W. ; CHIOU, W. L. (1990). Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. J. Chromatogr., v.531, p.3-50.
- PINKERTON, T. C.; HOWE, E. L.; ULRICH, E. L.; COMISKEY, J. P.; HAGINAKA, J.; MURASHIMA, T.; WALKENHORST, W. F.; WESTLER, W. M.; MARKLEY, J. L. (1995). Protein binding chiral discrimination of

HPLC stationary phases made with whole, fragmented, and third domain turkey ovomucoid. Anal. Chem., v.67, n.14, p.2354-67.

PIRKLE, W.H.; HOUSE, D.W.; FINN, J.M. (1980). Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases. J. Chromatogr., v.192, p.143-58.

PIRKLE, W.H.; FINN, J.M.; SCHREINER, J.L.; HAMPER, B. C. (1981). A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers. J.Am. Chem. Soc., v.103, n.13, p.3964-6.

PREVOT, M.; TOD, M.; CHALOM, J.; NICOLAS, P.; PETITJEAN O. (1992). Separation of propafenone enantiomers by liquid chromatography with a chiral counter ion. J. Chromatogr., v.605, p.33-9.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. (1992). Introducción a la HPLC aplicación y práctica-a. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro, cap.5, p.89-136: Cromatografía en fase ligada.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. (1992). Introducción a la HPLC aplicación y práctica-b. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro, cap.12, p.301-28: Validación de métodos.

ROCKLAND TECHNOLOGIES (1995). Ultron technical report. Rockland Technologies, Inc., Newport, p.1-7.

RODEN, D. M. (1994). Mirror, mirror on the wall... stereochemistry in therapeutics. /Editorial/ Circulation, v.89, n.5, p.2451-53, May.

ROMERO, J.R. (1998). Fundamentos de estereoquímica dos compostos orgânicos. Ribeirão Preto, Holos, p.1-47.

- SANTORO, M. I. R. M. (1992). Cromatografia líquida em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. Rev. Farm. Bioquim. USP, v.28, n.1, p.1-29, jan./jun..
- SCHILL, G.; WAINER, I. W.; BARKAN, S. A. (1986). Chiral separations of cationic and anionic drugs on an α_1 -acid glycoprotein-bonded stationary phase (ENANTIOPAC). J. Chromatogr., v.365, p.73-88.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; McDOWALL, R. D.; PITTMAN, K. A.; SPECTOR, S. (1992). Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Pharm. Res., v.9, p.588-92.
- SHIBATA, T.; MORI, K.; OKAMOTO, Y. Polysaccharide phases. In: KRSTULOVIC, A. M. (ed). (1989). Chiral separations by HPLC : applications to pharmaceutical compounds. Chichester, Ellis Horwood, cap.13, p.336-98.
- SIDDOWAY, L. A.; THOMPSON, K. A.; McALLISTER, B.; WANG, T.; WILKINSON, G. R.; RODEN, D. M.; WOOSLEY, R. L. (1987). Polymorphism of propafenone metabolism and disposition in man: clinical and pharmacokinetic consequences. Circulation, v.75, n.4, p.785-91.
- SRINIVAS, N. R.; IGWEMEZIE, N. L. (1992). Chiral separation by high performance liquid chromatography. I. Review on indirect separation of enantiomers as diastereomeric derivatives using ultraviolet, fluorescence and electrochemical detection. Biomed. Chromatogr., v.6, n.4, p.163-7.
- TANG, Y. (1996). 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.136-42.

TOPIOL, S. (1989). A general criterion for molecular recognition: implications for chiral interactions. Chirality, v.1, n.1, p.69-79.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. (1995). Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. Bull. Chem. Soc. Jpn., v.68, p.3289-307.