

ANÁLISE ENANTIOSELETIVA DE FÁRMACOS: CONTRIBUIÇÕES DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR

Pierina Sueli Bonato* e Valquíria Aparecida Polisel Jabor

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto - SP

Cristiane Masetto de Gaitani

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto - SP

Recebido em 2/7/04; aceito em 6/10/04; publicado na web em 17/2/05

ENANTIOSELECTIVE ANALYSIS OF DRUGS: CONTRIBUTIONS OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS. The demand for analytical methods suitable for accurate and reproducible determination of drug enantiomers has increased significantly in the last years. High-performance liquid chromatography (HPLC) using chiral stationary phases and capillary electrophoresis (CE) are the most important techniques used for this purpose. In this paper, the fundamental aspects of chiral separations using both techniques are presented. Some important aspects for the development of enantioselective methods, particularly for the analysis of drugs and metabolites in biological samples, are also discussed.

Keywords: chiral drugs; high-performance liquid chromatography; capillary electrophoresis.

INTRODUÇÃO

Por razões econômicas e dificuldades de ordem prática nos processos de produção, a maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas é comercializada como racemato, ou seja, mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros¹. No entanto, existem inúmeros exemplos de fármacos que apresentam atividades farmacológicas estereosseletivas (propriedades farmacodinâmicas), consequência de interações com receptores biológicos, que são altamente específicas². Um exemplo clássico que não pode ser esquecido é o da talidomida. Somente depois das investigações da contribuição das propriedades estereosseletivas desse fármaco, é que foi possível estabelecer que as propriedades teratogênicas da talidomida, que causaram deformidades físicas em recém nascidos cujas mães fizeram uso desse fármaco durante a gravidez, estavam relacionadas com o enantiômero (-)-(S)-³. Infelizmente, em estudos posteriores foi constatada a inversão de configuração não apenas *in vitro* mas também *in vivo* da talidomida^{4,5}, evidenciando que se o enantiômero (+)-(R)- puro tivesse sido administrado, teria sido parcialmente convertido no isômero responsável pelo efeito teratogênico. Exemplos menos drásticos que esse são bastante comuns, nos quais as diferenças existentes entre os dois enantiômeros podem ser qualitativas ou quantitativas, sendo que, nesse último caso, o enantiômero mais ativo é chamado de eutômero enquanto que ao outro dá-se o nome de distômero⁶. Estudos têm mostrado que β -bloqueadores, propranolol é um exemplo, se ligam estereosseletivamente a receptores β -adrenérgicos e que os enantiômeros (-) são os principais responsáveis pela atividade β -bloqueadora dessa classe de fármacos⁷.

Adicionalmente, quando um fármaco quiral é administrado como racemato, os dois enantiômeros podem apresentar os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (disposição cinética) de forma estereosseletiva⁸⁻¹¹. Desses processos, a estereosseletividade é mais significativa no metabolismo, devido ao envolvimento do sistema enzimático. Dentre os inúmeros exem-

plos, pode-se destacar o verapamil; o enantiômero ativo (-)-(S) é preferencialmente metabolizado pelo CYP3A4¹² (metabolismo de primeira passagem) e, dessa forma, a dose efetiva por via oral é cerca de 5 vezes maior que a dose por via intravenosa¹³.

A partir das observações de disposição cinética e dinâmica estereosseletivas, a questão da quiralidade passou a ser considerada no planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos. As autoridades governamentais que regularizam a produção e distribuição de medicamentos, como por ex. o "Food and Drug Administration" (FDA) nos Estados Unidos^{14,15} e órgãos equivalentes no Japão¹⁶, Canadá¹⁷ e Comunidade Européia¹⁸, enfatizam a necessidade de se ter informações sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas estereosseletivas de fármacos quirais e recomendam a produção de novos fármacos na forma de enantiômeros puros. Infelizmente no Brasil ainda não existe nenhuma orientação nesse sentido¹⁹.

Por outro lado, fármacos já comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados, no sentido de se avaliar suas propriedades cinéticas e dinâmicas estereosseletivas e verificar se existem vantagens na produção como enantiômero puro²⁰. Destacam-se como ex. os casos do omeprazol e da fluoxetina. O omeprazol, fármaco originalmente desenvolvido como racemato e empregado como redutor de secreções gástricas nos estados de refluxo gastroesofágico e úlceras gástricas e duodenais, está sendo agora também comercializado como enantiômero puro, (-)-(S), em razão de sua maior biodisponibilidade em relação ao racemato e por ter resultado em menor variabilidade do pH intragástrico, comprovando sua maior eficácia no controle da secreção ácida estomacal²¹.

Por outro lado, tentativas na utilização da (-)-(R)-fluoxetina como enantiômero puro no tratamento da depressão, por causa de sua cinética mais simples e menor efeito inibidor da enzima CYP2D6, não foram bem sucedidas em razão dos efeitos colaterais (ritmo cardíaco anormal) observados em estudos clínicos, que não são observados com o uso do racemato¹.

Todos esses dados apresentados acima foram um forte estímulo para o desenvolvimento de métodos analíticos enantioseletivos²²⁻²⁵. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um

*e-mail: psbonato@fcrp.usp.br

fármaco, seja em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas é, obviamente, um pré-requisito essencial para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e controlar a qualidade, respectivamente. As principais técnicas analíticas capazes de fornecer essas informações são baseadas na ciência da separação²⁵.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, "High-performance Liquid Chromatography") é a técnica mais utilizada para a separação de enantiômeros. Nesse caso, a separação pode ser conseguida por procedimentos indiretos e diretos. No procedimento indireto, o par de enantiômeros é submetido a uma reação de derivação com um reagente quiral e enantiomericamente puro, visando obter os diastereoisômeros, que podem ser separados empregando fases estacionárias não quirais. Nos procedimentos diretos, a separação do par de enantiômeros acontece pelo uso de fases móveis contendo aditivos quirais, ou então, pelo uso de fases estacionárias quirais. Não há dúvidas de que o desenvolvimento e a comercialização das fases estacionárias quirais (CSP, "Chiral Stationary Phase") empregadas em HPLC facilitou enormemente a obtenção de separações enantiosseletivas de fármacos quirais, inclusive em escala preparativa²⁶⁻²⁸. Porém, os métodos que empregam essa técnica requerem, além da coluna com fase estacionária quiral, altos volumes de solventes orgânicos que compõem a fase móvel para a eluição do fármaco, os quais são caros e podem levar à contaminação ambiental se não forem descartados corretamente.

Os últimos anos foram marcados pela implementação de outra importante técnica instrumental de separação, a eletroforese capilar (CE, "Capillary Electrophoresis"). Em CE, o uso de solventes orgânicos é praticamente nulo. Além disso, a alta eficiência obtida em CE facilita a separação de enantiômeros, a qual é possível com fatores de separação tão baixos quanto $\alpha = 1,01$. Outras vantagens que fazem a CE se estabelecer como uma das principais técnicas utilizadas em separações quirais são a versatilidade e simplicidade instrumental, menores tempos de análise e baixo consumo de reagentes caros^{25,29}.

Este trabalho tem como finalidade mostrar os fundamentos e os recentes avanços na análise de fármacos quirais empregando essas duas importantes ferramentas de separação e análise, bem como discutir algumas das particularidades em aplicações referentes a estudos de metabolismo e disposição cinética e na determinação da pureza enantiomérica.

ANÁLISE ENANTIOSELETIVA EMPREGANDO A CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS

Nas últimas duas décadas, inúmeros seletores quirais foram avaliados tanto para verificar suas habilidades de resolução quiral,

quanto para seu emprego na preparação de centenas de fases estacionárias quirais. Dentre essas fases, aquelas que se mostraram mais promissoras estão disponíveis comercialmente e são empregadas para aplicações diversas. Para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos, a literatura destaca o sucesso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos e em proteínas.

Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos

Polissacarídeos como a celulose e a amilose *in natura* apresentam limitada capacidade de resolução quiral. Por outro lado, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados como tris-benzoatos e tris-fenilcarbamatos, criando novos sítios para o reconhecimento quiral³⁰.

O primeiro derivado de polissacarídeo largamente usado, desenvolvido por Hesse e Hagel³¹, foi o triacetato de celulose (CTA-I), preparado por acetilação da celulose microcristalina em benzeno, que mostrou alta habilidade de reconhecimento quiral e capacidade. Outro tipo de fase estacionária com habilidade de reconhecimento quiral completamente diferente foi desenvolvido pelo grupo de Okamoto, através do recobrimento de partículas de sílica com a fase CTA-I³²⁻³⁴. A análise dessa fase indicou que a microcristalinidade não é essencial para o reconhecimento quiral³⁵.

A partir de então, inúmeras outras fases foram preparadas, recobrindo partículas de sílica macroporosa (geralmente modificadas com grupos aminopropil) com derivados de polissacarídeos. O suporte de sílica proporcionou a resistência mecânica necessária para a obtenção de colunas mais eficientes e estáveis frente a modificações na composição da fase móvel. A Tabela 1 mostra uma relação das fases estacionárias quirais mais importantes, produzidas pela Diacel Chem. Ind^{36,37}.

O mecanismo de discriminação quiral em fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos tem sido extensivamente investigado usando dados cromatográficos, espectroscópicos (ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas) e cálculos computacionais^{30,38}. Esses estudos sugerem que os derivados de celulose e amilose apresentam uma estrutura de "calha" helicoidal com os grupos carbamatos e benzoatos localizados no seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução quiral depende do ajuste dos enantiômeros nessa "calha" do polissacarídeo e da interação com os grupos carbamato e benzoato.

Nos derivados tris-benzoatos, os grupos carbonila polares dos ésteres podem interagir com os enantiômeros através de ligações

Tabela 1. Principais fases estacionárias quirais baseadas em polímeros helicoidais disponíveis comercialmente

Polissacarídeo	Derivado	Nome comercial
Celulose	Benzoato	CHIRALCEL OB, CHIRALCEL OB-H
	3,5-dimetilfenil carbamato	CHIRALCEL OD, CHIRALCEL OD-H, CHIRALCEL OD-R, CHIRALCEL OD-RH
	4-metilbenzoato	CHIRALCEL OJ, CHIRALCEL OJ-H, CHIRALCEL OJ-RH
	4-metilfenil carbamato	CHIRALCEL OG
	4-clorofenil carbamato	CHIRALCEL OF
	Cinimato	CHIRALCEL OK
	Fenil carbamato	CHIRALCEL OC
Amilose	3,5-dimetilfenil carbamato	CHIRALPAK AD, CHIRALPAK AD-H, CHIRALPAK AD-RH
	(S)- α -metilbenzil carbamato	CHIRALPAK AS, CHIRALPAK AS-H, CHIRALPAK AS-RH

A denominação "H" significa fase estacionária preparada com sílica de 5 μm . A denominação "R" é referente ao uso da coluna no modo fase reversa.

de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Quando o grupo fenil do tris-benzoato de celulose é substituído, a habilidade de reconhecimento quiral é grandemente influenciada pelo tipo de grupo introduzido. Derivados benzoato tendo substituintes doadores de elétrons, como o grupo metil, possuem maior habilidade de reconhecimento quiral quando comparados com substituintes aceptores de elétrons, como halogênios^{38,39}.

Nos derivados tris-fenilcarbamatatos, solutos quirais podem interagir através de ligações de hidrogênio com os grupos NH e C=O e interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. As interações π - π do grupo fenil da fase estacionária com grupos aromáticos do soluto podem ser menos importantes que as interações polares, mas elas não podem ser ignoradas, principalmente em separações no modo fase reversa. A habilidade de reconhecimento quiral também é grandemente influenciada pelos substituintes do grupo fenil, como por ex., grupos metil, etil, halogênios ou NO₂. O efeito indutivo dos substituintes influencia a resolução quiral quando eles estão nas posições 3 ou 4. Geralmente, a introdução de um grupo doador de elétrons (metil) ou aceptor de elétrons (halogênios) nessas posições melhora a resolução de muitos racematos³⁰. Derivados fenilcarbamatatos de celulose substituídos na posição 2 mostram um baixo grau de resolução, provavelmente porque o impedimento estereo de grupos metil nessa posição impede que o derivado fenilcarbamato assumam uma estrutura regular. Menor grau de resolução quiral também é observado quando os substituintes do anel aromático são os grupos NO₂ ou OCH₃, nesse caso por causa da alta polaridade desses grupos³⁹.

O uso de fases estacionárias baseadas em derivados de celulose e amilose tem mostrado que o mesmo derivado, embora proveniente de polissacarídeo diferente, pode resultar em habilidade de resolução quiral totalmente distinta. Foi proposto que as conformações 3/2 da cadeia helicoidal dos derivados de celulose e 4/1 dos derivados de amilose são responsáveis pelas diferenças cromatográficas entre as fases estacionárias baseadas em tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose e amilose^{38,40}.

As fases estacionárias baseadas em derivados de polissacarídeos podem ser empregadas em três modos de eluição: fase normal, fase reversa e polar orgânico^{30,41,42}. O modo fase normal é caracterizado pelo uso de fases móveis compostas de hexano-álcool, normalmente isopropanol ou etanol. A essa mistura de solventes orgânicos pode-se adicionar pequenas quantidades (até 0,5%, v/v) de uma base orgânica (dietilamina) ou um ácido orgânico (ácido trifluoracético). O emprego desses aditivos tem por finalidade principal reduzir a interação de analitos básicos e ácidos, respectivamente, com os grupos silanóis residuais presentes na sílica empregada como suporte para essas fases estacionárias⁴³. No modo fase normal, observa-se que a retenção não quiral é função da polaridade do composto que está sendo analisado. Dessa forma, metabólitos que normalmente são mais polares que o fármaco de origem eluem com tempos de retenção superiores. Entretanto, como as interações enantiosseletivas ocorrem simultaneamente, às vezes observa-se inversões nesse comportamento, como no caso do omeprazol e seu metabólito, hidroxioimeprazol, analisados na coluna Chiralpak AD. Empregando fase móvel constituída por etanol-hexano (70:30, v/v), observou-se que o enantiômero (-)-(S)-omeprazol eluiu com tempo de retenção intermediário ao dos enantiômeros do metabólito⁴⁴.

Comportamentos cromatográficos não usuais, inclusive com inversões na ordem de retenção dos enantiômeros, também têm sido observados por mudanças no tipo de álcool empregado na composição da fase móvel^{45,46}, provavelmente devido a alterações no ambiente estereo da cavidade quiral da fase estacionária, induzidas pelo tipo de álcool usado⁴⁷.

No modo fase reversa, as colunas são empregadas com fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico

miscível, normalmente acetonitrila ou metanol. A enantioseparação de solutos ácidos normalmente é feita em meio ácido, de tal modo a manter os analitos na forma não ionizada enquanto que, para a separação de solutos básicos, dois parâmetros precisam ser otimizados, o pH e o tipo de solução tampão empregados. Em função de limitações com relação à estabilidade do suporte de sílica, é mais adequado o emprego de fases móveis com pH menor que 7. Nesses valores de pH, solutos básicos encontram-se muitas vezes positivamente carregados e não são capazes de interagir de forma eficaz com a fase estacionária. Para possibilitar que esse soluto positivamente carregado se torne acessível à fase estacionária, é necessário adicionar certos ânions (por ex., perclorato) à fase móvel, visando a formação de pares iônicos, que podem ser considerados eletricamente neutros^{41,48}. Ishikawa e Shibata⁴⁹ relataram que a ordem de retenção de solutos básicos é função da caotropicidade do contra-íon usado. Quanto maior a concentração do ânion, maior será a formação dos pares iônicos e, portanto, maior será a retenção e separação. A concentração máxima empregada depende da solubilidade do reagente de pareamento na fase móvel.

Infelizmente, para a fase estacionária baseada em amilose tris(3,5-dimetilfenilcarbamato), o uso de reagentes para formação de pares iônicos não foi tão efetivo e, nesse caso, as separações de compostos básicos precisam ocorrer em meio alcalino. Para resolver esse problema, os fabricantes introduziram novos tratamentos na superfície da sílica dessa e de outras fases estacionárias, tornando as novas colunas⁴¹ (Chiralcel OD-RH, Chiralcel OJ-R e Chiralpak AD-RH) estáveis a pH 9.

O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, propanol, ou ainda misturas desses solventes⁴². O uso desse tipo de fase móvel representa uma alternativa adicional para se obter a separação desejada, inclusive com possibilidade de inversão na ordem de retenção, maior solubilidade de alguns compostos e, por serem mais facilmente removidas e reutilizadas, essas fases são bastante atrativas para separações em escalas preparativas⁵⁰. O comportamento da separação nesse sistema depende não apenas da fase móvel e fase estacionária, mas também da natureza dos compostos separados⁴².

Embora os fabricantes de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos recomendem colunas específicas para cada modo de eluição, alguns autores relatam o emprego dessas colunas nos três modos de eluição⁵¹. Recentemente, uma coluna Chiralcel OD-H foi usada no modo fase reversa, por nosso grupo, para a resolução simultânea dos enantiômeros da primaquina e seu metabólito, carboxiprimaquina, com excelentes resolução e estabilidade⁵².

Nas fases estacionárias disponíveis comercialmente, os derivados de polissacarídeos encontram-se recobridos as partículas de sílica usada como suporte. Isto limita a seleção da fase móvel a alguns solventes compatíveis, nos quais os derivados não são solúveis. Na tentativa de desenvolver fases mais estáveis, alguns grupos de pesquisadores têm relatado a obtenção de fases estacionárias através da imobilização química do derivado ao suporte de sílica⁵³⁻⁵⁶. Outra direção no desenvolvimento de novas fases, é o uso de derivados de polissacarídeos modificados regioselectivamente. O objetivo é produzir novas fases, nas quais diferentes substituintes são introduzidos em posições específicas das unidades de glicose. Em princípio, quatro possibilidades podem ser usadas para os derivados de celulose e amilose: polissacarídeos contendo diferentes substituintes éster ou carbamato nas posições O-C(2,3) e O-C(6) ou derivados de polissacarídeos substituídos com benzoatos nas posições 2 e 3 e carbamato na posição 6 ou vice e versa⁵⁷.

Novas fases preparadas a partir de outros polissacarídeos como dextrana, quitosana, xilana e amilopectina, etc⁵⁸⁻⁶¹ também estão

sendo desenvolvidas, embora ainda não estejam disponíveis comercialmente.

Fases quirais protéicas

Em 1973 foi descrito o primeiro trabalho usando cromatografia por afinidade para a resolução quiral⁶². Os autores usaram uma coluna de albumina bovina sobre agarose para separar os enantiômeros do triptofano. Posteriormente, o grupo de Allenmark^{63,64} relatou a imobilização de albumina bovina em sílica gel e mostrou a versatilidade desta técnica para resolução quiral em escala analítica. Para melhorar a eficiência e estabilidade da coluna foram desenvolvidas técnicas para ligação covalente de proteínas às partículas de sílica modificadas com grupos aminopropil ou glicidoxipropil. Atualmente, colunas quirais baseadas em várias proteínas estão disponíveis comercialmente e encontram-se descritas na Tabela 2. Essas fases apresentam enantiosseletividade para um grande número de compostos, permitindo a análise direta, ou seja, sem necessidade de derivação. Por outro lado, a baixa capacidade e menor estabilidade das colunas e o limitado entendimento dos mecanismos de separação são fatores limitantes⁶⁵.

Interações altamente seletivas entre certas moléculas e as proteínas no sistema biológico fornecem a base da cromatografia com fases quirais protéicas. O mecanismo de resolução quiral envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas, fatores estéreos, ligações de hidrogênio e interações por transferência de cargas. Portanto, a resolução quiral depende das condições cromatográficas tais como pH, força iônica, concentração e tipo do modificador orgânico, temperatura e presença de aditivos carregados⁶⁶.

O pH afeta significativamente não apenas a retenção mas também a enantiosseletividade. Tomando-se como exemplo a separação dos enantiômeros de um composto básico, empregando uma coluna baseada na proteína ovomucóide (ponto isoelétrico = 4.1), verifica-se que um aumento no pH da fase móvel (no intervalo de 3 a 6) acarreta um aumento na retenção dos enantiômeros, devido ao aumento na interação eletrostática entre o soluto carregado positivamente nesse intervalo de pH e a proteína, cuja densidade de cargas negativas aumenta à medida em que o pH é aumentado. A maior retenção dos enantiômeros leva a uma maior separação⁵². Além disso, em função do pH da fase móvel, a distribuição de cargas na proteína é alterada, modificando os sítios de discriminação quiral

e, conseqüentemente, a enantiosseletividade da proteína, podendo haver, inclusive, inversão na ordem de retenção⁶⁷. A interação eletrostática entre a proteína e o soluto carregado também é afetada pela concentração do tampão empregado na fase móvel.

A porcentagem de solvente orgânico e o tipo de solvente adicionado à fase móvel afetam as interações hidrofóbicas com os sítios apolares presentes na proteína. Assim, aumentando-se a polaridade da fase móvel pela mudança no tipo de solvente orgânico usado ou redução na sua porcentagem, observa-se um aumento na retenção dos enantiômeros, compatível com o modo de eluição em fase reversa⁵². Mudanças no tipo de solvente orgânico usado também podem alterar a conformação da proteína, mudando a disposição dos sítios de discriminação quiral⁶⁶.

Modificadores catiônicos (sais de amônio quaternários, alquilaminas) e aniônicos (alquilsulfonatos, ácidos carboxílicos hidrofóbicos) também têm sido usados para regular a retenção e separação nas colunas AGP e OVM. Modificadores catiônicos reduzem a retenção e enantiosseletividade de fármacos básicos, devido ao efeito competitivo entre o aditivo e o fármaco pelos sítios carregados negativamente da proteína. Por outro lado, esses aditivos melhoram a separação de compostos ácidos, em decorrência da formação de pares iônicos. Esses aditivos também podem ocasionar alterações na conformação da proteína, afetando sua enantiosseletividade⁶⁶.

Aumentos na temperatura da coluna cromatográfica geralmente reduzem a retenção e enantiosseletividade mas, em alguns casos, observa-se comportamentos distintos, o que pode levar a inversões na ordem de retenção^{46,67}.

Outras fases estacionárias quirais

Além das fases estacionárias quirais discutidas acima, outras também são descritas na literatura e empregadas, embora em menor proporção, com sucesso para separações diversas. A Tabela 3 relaciona algumas dessas fases disponíveis comercialmente⁶⁸.

ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA EMPREGANDO A ELETROFORESE CAPILAR

Fundamentos da técnica

O emprego da CE como técnica de separação segue os mesmos

Tabela 2. Fases estacionárias protéicas disponíveis comercialmente

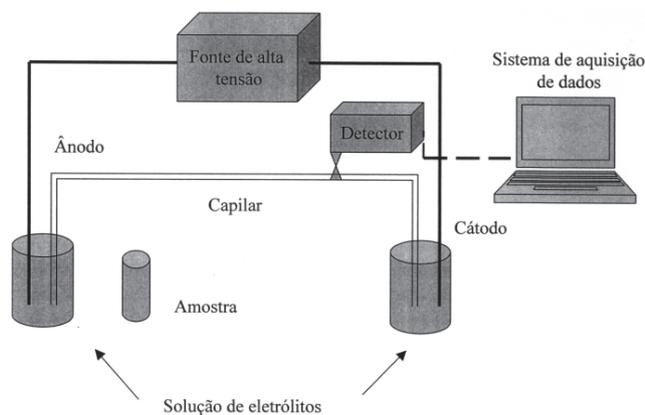
Proteína	Origem	Propriedades da proteína			Nome comercial	Fabricante
		Massa molar	carboidrato (%)	Ponto isoelétrico		
Soralbumina	Soro bovino	66.000	-	4,7	RESOLVOSIL BSA-7 ULTRON ES-BSA CHIRAL BSA	MACHERY NAGEL SHINWA CHEM. IND. SHANDON
Soroalbumina	Soro humano	65.000	-	4,7	CHIRAL HSA CHIRAL-HSA	SHANDON CHROMTECH AB
α_1 -glicoproteína ácida	Soro humano ou bovino	41.000	45	2,7	CHIRAL-AGP	CHROMTECH AB
Ovomucóide	Clara de ovo	28.000	30	4,1	ULTRON ES-OVM	SHINWA CHEM. IND.
Avidina	Clara de ovo	66.000	7	10,0	BIOPTIC AV-1	GL SCIENCES
Celobioidrolase I	Fungo	64.000	6	3,9	CHIRAL-CBH	CHROMTECH AB
Pepsina	Estômago suíno	34.600	-	< 1,0	ULTRON ES-PEPSIN	SHINWA CHEM. IND.

Tabela 3. Algumas outras fases estacionárias quirais disponíveis comercialmente

Tipo	Seletor quiral	Nome comercial	Fabricante
Seletor de baixa massa molar	D-dinitrobenzoilfenilglicina	CHIRAL 2	MACHEREY-NAGEL
	L-dinitrobenzoilfenilglicina	CHIRAL 3	MACHEREY-NAGEL
	(3R,4R)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetraidrofenantreno	(S,S)-Whelk-O1	REGIS TECHNOLOGIES
	(3S,4S)-4-(3,5-dinitrobenzamido)1,2,3,4-tetraidrofenantreno	(R,R)-Whelk-O1	REGIS TECHNOLOGIES
Troca de ligante	N,N diocetil-L-alanina	CHIRALPAK MA(+)	DIACEL
	L-hidroxiprolina - cobre	CHIRAL 1	MACHEREY-NAGEL
Antibióticos macrocíclicos	Vancomicina	CHIROBIOTIC V	ADVANCED SEPARATION TECHNOLOGIES
	Teicoplanin	CHIROBIOTIC T	TECHNOLOGIES
	Ristocetin	CHIROBIOTIC R	
Éter coroa	(S)-18- coroa -6-éter	CROWNPAK CR(+)	DIACEL
	(R)-18- coroa -6-éter	CROWNPAK CR(-)	DIACEL
Ciclodextrinas	β -ciclodextrina	NUCLEODEX β -OH	MACHEREY-NAGEL
	β -ciclodextrina permetilada	NUCLEODEX β -PM	MACHEREY-NAGEL
	β -ciclodextrina fenilcarbamato	ULTRON ES-PhCD	SHINWA CHEM. IND.

princípios da eletroforese clássica, porém, a separação é conduzida em tubos capilares com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 30 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor e submetidos à ação de um elevado campo elétrico⁶⁹. O uso de tubos com dimensões capilares minimiza as limitações relativas ao efeito Joule, já que a geometria do capilar (elevada área superficial interna relativa ao volume) favorece a dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica. Com isso, pode-se aplicar campos elétricos elevados, resultando em maior eficiência e redução do tempo de análise⁷⁰.

Um esquema típico de um sistema de CE é mostrado na Figura 1. A fonte regulável de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, com valores de tensão de até 30 kV. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos (geralmente de platina), a dois reservatórios contendo uma solução de eletrólitos. Um dos eletrodos é conectado a um cabo condutor da fonte, ao passo que o outro é conectado a um fio terra, que resulta na obtenção de um ânodo (+) e um cátodo (-), respectivamente⁶⁹. Primeiramente, o tubo capilar de sílica fundida é preenchido com uma solução de eletrólitos conveniente (geralmente uma solução tampão aquosa). A seguir, um volume da solução de amostra, da ordem de 1 a 20 nanolitros, é introduzido na extremidade frontal do capilar (usualmente o ânodo), pela substituição de um dos reservatórios da solução tampão por outro que contém a amostra. A detecção dos compostos separados é feita na extremidade

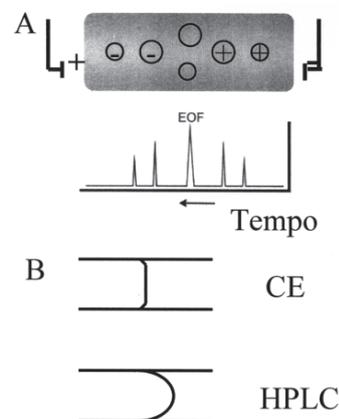
**Figura 1.** Esquema de um equipamento de eletroforese capilar

terminal do capilar. Após a introdução da amostra, as extremidades do capilar e os eletrodos são imersos nos reservatórios que contêm a solução tampão para completar o contato elétrico. Para minimizar os efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante^{69,70}.

A aplicação de um potencial elétrico através do capilar causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos. O movimento eletroforético ou mobilidade eletroforética é inerente à espécie iônica. Portanto, cátions migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) e os ânions migram em direção ao ânodo (eletrodo positivo). Quanto maior a carga e menor o tamanho do íon, maior será a mobilidade. Por outro lado, o movimento eletrosmótico origina-se no ânodo, segue em direção ao cátodo e bombeia eficientemente os íons do soluto ao longo do capilar em direção ao detector⁶⁹. Esse movimento, denominado fluxo eletrosmótico (EOF, "Electroosmotic Flow"), ocorre em razão da ionização dos grupos silanóis ácidos (SiOH) presentes na parede interna do capilar de sílica quando em contato com a solução tampão⁷¹.

Como ilustrado na Figura 2A, o movimento líquido das espécies carregadas é a soma do EOF com a migração individual das espécies. Primeiramente eluem os cátions, por possuírem migração eletroforética na mesma direção do EOF. As espécies neutras caminham na mesma velocidade do EOF e os ânions, mais lentamente, já que seus movimentos eletroforéticos são opostos ao do EOF⁷¹.

Além de permitir a análise simultânea de compostos neutros e

**Figura 2.** Esquema da separação de analitos com diferentes cargas em CE no modo FSCE. EOF= Fluxo eletrosmótico

carregados positiva ou negativamente, o perfil do EOF é o responsável pela maior vantagem metodológica da CE, em relação à HPLC que é a sua eficiência (Figura 2B). Ao contrário do perfil parabólico apresentado em HPLC, devido ao uso de bombas, o EOF apresenta um perfil plano, apenas um pouco mais lento nas proximidades da parede do capilar, o que resulta em menor resistência à transferência de massa e faz com que todas as moléculas tenham a mesma velocidade. Isso reflete na menor dispersão da amostra e, portanto, em maior eficiência⁷².

Separação de enantiômeros por CE

A separação de enantiômeros por CE é feita principalmente pela adição de seletores quirais na solução de eletrólitos, resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A diferença de estabilidade das interações dos enantiômeros com o seletor quiral ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes e proporciona a separação. Quando o seletor quiral adicionado à solução de eletrólitos é neutro, a separação acontece no modo denominado eletroforese capilar em solução livre (FSCE, “Free Solution Capillary Electrophoresis”) e esse modo é conveniente para a separação de solutos carregados no pH da solução tampão em que a análise está sendo feita. Solutos neutros, mas também aqueles que se encontram carregados no pH da solução tampão empregada para análise, podem ser resolvidos pelo uso de seletores quirais carregados ou seletores não carregados, desde que se tenha também no meio um tensoativo não quiral (modo cromatografia eletrocinética, EKC, “Electrokinetic Chromatography”). Esse modo de separação também acontece quando se emprega tensoativos quirais⁷³.

Outra forma de separar enantiômeros empregando técnicas eletroforéticas é através do uso de fases estacionárias quirais na chamada eletrocromatografia capilar (CEC, “Capillary Electrochromatography”). Nesse caso, o processo eletroforético acontece em capilares de sílica recheados com fases estacionárias quirais. CEC é uma técnica híbrida que aproveita as vantagens da CE, ou seja,

reduzido consumo de solventes e alta eficiência, e da cromatografia líquida de alta eficiência, ou seja, seletividade adicional devido ao uso de uma fase estacionária⁷⁴⁻⁷⁶.

Dos vários seletores quirais utilizados, as ciclodextrinas (CD) e seus derivados são, reconhecidamente, os mais importantes. Estima-se que cerca de 80% das separações enantioméricas em CE são obtidas pelo uso de CDs^{77,78}. Dessa forma, esses seletores quirais serão discutidos em detalhes. A Tabela 4 relaciona outros seletores quirais importantes, bem como algumas de suas propriedades^{77,79}.

As propriedades extraordinárias das CDs originam-se de sua estrutura única (Figura 3). As CDs são moléculas cíclicas de oligosacarídeos quirais de origem natural, com forma similar à de um cone truncado, consistindo de seis, sete ou oito unidades de (+)-(D)-glicopiranosose unidas por ligações $\alpha(1-4)$, as quais são denominadas α -, β - e γ -CD, respectivamente⁸⁰. O diâmetro e o volume da cavidade variam com o número de unidades de glicose no anel da CD. A cavidade interna da CD é relativamente hidrofóbica, enquanto que as bordas da cavidade são hidrofílicas, devido à presença de grupos hidroxilas primários e secundários (Figura 3). Esses grupos hidroxilas podem ser facilmente modificados, originando inúmeros derivados neutros ou carregados. Essa derivação aumen-

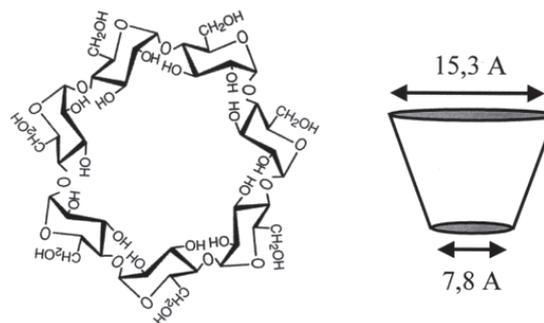


Figura 3. Estrutura da β -ciclodextrina

Tabela 4. Outros seletores quirais empregados em eletroforese capilar e eletrocromatografia capilar

Seletor quiral	Exemplos	Mecanismo
Éter coroa	Ácido (+)-(18-coroa-6)-2,3,11,12-tetracarboxílico	Complexos de inclusão baseados em interações íon-dipolo entre grupos amino primários protonados do soluto e átomos doadores de elétrons da estrutura do éter coroa. Interações secundárias entre os enantiômeros e os substituintes do éter coroa também participam do mecanismo
Polissacarídeos neutros	Dextrana, dextrina (maltodextrina)	Em solução aquosa apresentam conformação helicoidal, responsável pelo reconhecimento quiral
Polissacarídeos carregados	Heparina, condroitin sulfato, aminoglicosídeos	Interação com a estrutura helicoidal e grupos carregados
Proteínas	Soroalbumina bovina, soroalbumina humana, α 1-glicoproteína ácida, proteína ovomucóide, avidina, celobioidrolases	Separação baseada em princípios de bioafinidade. Problemas de adsorção nas paredes do capilar e com a detecção, devido à absorção na região do UV quando adicionadas à solução de eletrólitos (CE). Mais usada em CEC
Antibióticos macrocíclicos	Ansamicinas (rifamicina B, rifamicina SV) e glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanin, avoparcin e ristocetin A)	Mecanismo da separação depende da inclusão do analito nas cavidades hidrofóbicas, de interações dipolares, ligações de hidrogênio, interações π - π ou eletrostáticas. Mais usados em CEC
Tensoativos quirais	Sais biliares (colato de sódio, taurocolato de sódio, deoxicolato de sódio)	Inclusão em micelas helicoidais

ta a solubilidade da CD e altera suas propriedades enantiosseletivas.

Para que ocorra o reconhecimento quiral, pelo menos uma parte da molécula hóspede deverá entrar adequadamente na cavidade da CD. O complexo de inclusão formado pode ser estabilizado por interações secundárias específicas entre a parte da molécula do soluto que ficou para fora da cavidade e os grupos hidroxilas ou outros grupos funcionais da borda da CD, principalmente por interações como ligações de hidrogênio. Outras interações incluem as interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo e de transferência de carga⁸¹.

A estabilidade dos complexos de inclusão é influenciada por diversos parâmetros como, por ex., a estrutura química e hidrofobicidade da molécula hóspede, contra-íon, pH e concentração da solução de eletrólitos, presença de solvente orgânico, temperatura, tipo do grupo funcional de derivação e concentração da CD⁸¹.

Dentre os derivados neutros das CDs, destacam-se as β -CD metiladas (heptakis 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina e heptakis-2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina) e β -CD hidroxipropilada (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina)⁸¹. Derivados neutros de outras CDs (α -CD e γ -CD) também têm sido empregados, embora em menor proporção⁸². A separação enantiosseletiva de solutos básicos empregando CDs e seus derivados neutros é feita em meio ácido para que esses solutos possam apresentar carga positiva e migrar do ponto de injeção em direção ao detector. Se a CD empregada não possuir carga, sua migração será mínima, já que ela irá migrar junto com o EOF que, nesse caso, é baixo. Portanto, o enantiômero que formar o complexo de inclusão mais estável com a CD terá um maior tempo de migração. Os solutos ácidos deveriam ser separados em meio básico para que pudessem apresentar carga negativa e fossem retardados em relação ao EOF. Entretanto, separações de solutos ácidos na forma carregada não têm se mostrado muito eficazes⁸³. Os solutos neutros não podem ser separados pelo modo FSCE, pois nem a CD nem o analito são carregados.

A separação de solutos neutros pode ser obtida pela sua complexação com CDs carregadas no modo denominado EKC. Entre os derivados carregados de CDs disponíveis comercialmente, destacam-se a β -CD carboxilada, a β -CD sulfobutiléter e a β -CD sulfatada. Essas CDs estão sendo cada vez mais citadas na literatura, em um grande número de separações quirais para compostos de diferentes classes^{81,84-95}.

A separação de enantiômeros empregando os derivados de CDs depende não apenas do tipo de CD e de sua concentração, mas também de outras características como grau de substituição e posição em que os substituintes se encontram. No caso particular da β -CD sulfatada, as separações podem ser obtidas empregando derivados aleatoriamente substituídos com grau de substituição (DS) de 7-11 ou derivados altamente substituídos (DS = 12), nos quais os grupos hidroxilas do carbono 6 estão completamente sulfatados, os grupos da posição 2, parcialmente sulfatados (70%) e os da posição 3 encontram-se não substituídos⁸⁴.

A separação de enantiômeros empregando CDs também pode ser feita no modo MEKC através da combinação de tensoativos aquirais com carga, como o dodecilsulfato de sódio, e CDs neutras. Os enantiômeros são solubilizados pela micela e complexados pela CD. Quando o equilíbrio de distribuição é estabelecido, o enantiômero que formar o complexo mais estável com a CD será menos retido⁷³.

A separação de enantiômeros empregando CDs está em contínuo desenvolvimento surgindo, a todo momento, novos derivados e formas de se realizar as separações. Uma das tendências é a utilização de mais de um seletor quiral na solução de eletrólitos, ou seja, duas CDs⁹⁶⁻⁹⁹ ou ainda, uma CD e outro seletor quiral⁹⁰. Resultados bastante satisfatórios têm sido observados particularmente com o uso de uma CD neutra e outra carregada. A CD neutra

confere enantiosseletividade ao sistema, enquanto que a CD carregada pode conferir enantiosseletividade adicional, ou simplesmente conferir carga aos analitos analisados na forma não carregada, para que possam migrar em direção ao detector⁹⁸⁻¹⁰⁰.

O uso de CDs no modo não aquoso também tem se mostrado eficaz, particularmente para fármacos com problemas de solubilidade ou estabilidade em meio aquoso e para obtenção de seletividade adicional^{101,102}. Nesse caso, as separações acontecem em soluções de eletrólitos preparadas em solventes como acetonitrila e formamida.

ASPECTOS RELEVANTES NA ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA

A determinação do excesso ou pureza enantiomérica de matéria-prima e formulações farmacêuticas comercializadas como enantiômeros puros e os estudos de disposição cinética estereosseletiva são as principais aplicações da análise enantiosseletiva de fármacos e medicamentos empregando as técnicas de HPLC ou CE.

Essas aplicações, principalmente nos estudos de disposição cinética, freqüentemente requerem métodos com baixos limites de detecção e quantificação, seletivos e rápidos, uma vez que envolvem um grande número de análises de amostras complexas (plasma, urina, etc) contendo pequenas quantidades do fármaco ou metabólitos. Para atender essas exigências analíticas, o uso de detectores mais sensíveis e seletivos tem sido cada vez mais acentuado. No caso de HPLC, destaca-se o uso do espectrômetro de massas (LC-MS ou LC-MS-MS), que permite obter alta seletividade e baixos limites de detecção e quantificação ou então informações estruturais adicionais dos fármacos em análise^{103,104}. No caso da CE, esse detector também tem sido empregado¹⁰⁵, bem como o detector por fluorescência induzida a laser (LIF, "Laser Induced Fluorescence")^{106,107}.

No caso específico da CE, na qual apenas pequenos volumes de amostra podem ser analisados, o que resulta em métodos com limites de detecção e quantificação superiores aos obtidos com HPLC, estão sendo desenvolvidos procedimentos específicos que permitem injetar um maior volume de amostra, sem que haja alargamento das bandas, com conseqüente perda de eficiência. Dentre esses procedimentos, o mais simples é chamado de empilhamento dos analitos ("stacking"), caracterizado pela dissolução da amostra em uma solução tampão em geral mais diluída que aquela usada na análise¹⁰⁸.

Outra preocupação dos usuários dessas técnicas em análises enantiosseletivas está nos procedimentos de preparação das amostras, que têm por finalidade eliminar interferentes, concentrar os analitos e torná-las compatíveis com o sistema usado. Técnicas como extração líquido-líquido e extração em fase sólida são empregadas com freqüência¹⁰⁹. Novas técnicas de extração, como microextração em fase sólida¹¹⁰ e extração com membranas¹¹¹, também vêm sendo sistematicamente estudadas para viabilizar suas aplicações.

Dentre as tendências tecnológicas atuais da instrumentação química, a miniaturização apresenta um desenvolvimento rápido e contínuo. As separações analíticas realizadas em micro-escala proporcionam a redução marcante dos tempos de análise, a execução das análises *in loco* (equipamentos portáteis) e com volumes de amostras e reagentes extremamente baixos (da ordem de nanolitros ou picolitros)¹¹².

Essa tendência tem se mostrado mais significativa para a CE devido à própria concepção da técnica relativa à eficiência, rapidez e baixo consumo de reagentes. Várias separações enantioméricas já foram obtidas em CE-microchip, empregando, principalmente,

CDs como seletores quirais^{113,114}. Devido às limitações geométricas dos “microchips” e por causa do material empregado nas suas construções, em geral não transparentes no UV, têm sido adotados sistemas de detecção mais sensíveis, como LIF e detectores eletroquímicos.

Os métodos desenvolvidos para essas aplicações precisam apresentar uma série de características que os habilitem a serem utilizados de forma segura. Sendo assim, uma vez otimizados, os procedimentos de análise precisam ser validados segundo critérios estabelecidos na literatura¹¹⁵⁻¹¹⁹.

Normalmente, o processo de validação é feito empregando o fármaco na forma de mistura racêmica. Portanto, além dos parâmetros normalmente avaliados, a análise enantiosseletiva requer também um estudo detalhado da estabilidade dos enantiômeros separados na solução-padrão, fase móvel e fluido biológico, se pertinente. É necessário verificar, ainda, as possibilidades de estereoisomerização ou racemização¹²⁰.

CONTRIBUIÇÃO DE GRUPOS BRASILEIROS NA ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DE FÁRMACOS

A análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos é uma das mais importantes aplicações da HPLC e CE e o número de trabalhos relacionados com esse tema tem crescido continuamente. No Brasil, quatro grupos principais têm contribuído efetivamente para os desenvolvimentos nessa área. Dois grupos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP vêm atuando, desde 1990, no desenvolvimento de métodos para análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em fluidos biológicos, visando a aplicação em estudos de metabolismo e disposição cinética. Para o desenvolvimento desses métodos estão sendo empregadas as técnicas de HPLC e CE. As referências já citadas nesse texto^{44,48,52,89-95,100,104,110} e algumas outras publicações recentes¹²¹⁻¹²⁴ demonstram o grande envolvimento desses grupos na análise enantiosseletiva de fármacos e metabólitos em materiais biológicos. Como as análises são feitas em matrizes biológicas complexas e analitos presentes em quantidades muito baixas, também estão sendo desenvolvidos e validados novos procedimentos de preparação da amostra como, por ex., a microextração em fase sólida¹¹⁰. Graças a esses métodos desenvolvidos, vários estudos de disposição cinética estão sendo realizados, possibilitando estabelecer a influência de várias doenças e aspectos genéticos na disposição cinética de fármacos quirais, sendo citados apenas os mais recentes¹²⁵⁻¹²⁹.

Um outro grupo, do Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, atua no desenvolvimento de novas fases estacionárias quirais e modos de separação e, mais recentemente, em aplicações na análise de fármacos quirais em materiais biológicos. As publicações mais recentes desse grupo¹³⁰⁻¹³⁴ também atestam sua importante contribuição na análise enantiosseletiva empregando HPLC.

O grupo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP atua, principalmente, propondo procedimentos para controle de qualidade de fármacos quirais em matérias-primas e formulações farmacêuticas¹³⁵⁻¹³⁷.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros e bolsas.

REFERÊNCIAS

- McConathy, J.; Owens, M. J.; *Primary Care Companion J. Clin. Psychiatry* **2003**, *5*, 70.
- Waldeck, B.; *Chirality* **1993**, *5*, 350.
- Blaschke, G.; Kraft, H. P.; Fickentscher, K.; Kohler, F.; *Arzneim.-Forsch.* **1979**, *29*, 1640.
- Eriksson, T.; Bjorkman, S.; Roth, B.; Fyge, A.; Hoglund, P.; *Chirality* **1995**, *7*, 44.
- Eriksson, T.; Bjorkman, S.; Hoglund, P.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *57*, 365.
- Eliel, E. L.; *Chirality* **1997**, *9*, 428.
- Mehvar, R.; Brocks, D. R.; *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2001**, *4*, 185.
- Caldwell, J.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 39.
- Midha, K. K.; McKay, G.; Rawson, M. J.; Hubbard, J. W.; *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 797.
- Wainer, I. W.; Ducharme, J.; Granvil, C. P.; Parenteau, H.; Abdullah, S.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 169.
- Mehvar, R.; Jamali, F.; *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *33*, 122.
- Engman, H.; Tannergren, C.; Artursson, P.; Lennernäs, H.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *19*, 57.
- Eichelbaum, M.; Mikus, G.; Vogelgesang, B.; *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *17*, 453.
- De Camp, W. H.; *Chirality* **1989**, *1*, 2.
- <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo/htm>, acessada em Junho 2004.
- Shindo, H.; Caldwell, J.; *Chirality* **1995**, *7*, 349.
- http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/stereo_e.html, acessada em Junho 2004.
- <http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-7/B/7BQ4a.pdf>, acessada em Junho 2004.
- <http://www.anvisa.gov.br>, acessada em Junho 2004.
- Tucker, G. T.; *The Lancet* **2000**, *355*, 1085.
- Lind, T.; Rydberg, L.; Kyleback, A.; Jonsson, A.; Andersson, T.; Hasselgren, G.; Holmberg, J.; Rohss, K.; *Alim. Pharmacol. Ther.* **2000**, *14*, 861.
- Caldwell, J.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *719*, 3.
- Marzo, A.; Balant, L. P.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1996**, *678*, 73.
- Marzo, A.; Heftmann, E.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *54*, 57.
- Hadley, M. R.; Camilleri, P.; Hutt, A. J.; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1953.
- Francotte, E. R.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 379.
- Andersson, S.; Allenmark, S. G.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *54*, 11.
- Grill, C. M.; Miller, L.; Yan, T. Q.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1026*, 101.
- Blaschke, G.; Chankvetadze, B.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 3.
- Yashima, E.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 105.
- Hesse, G.; Hagel, R.; *Chromatographia* **1973**, *6*, 277.
- Ichida, A.; Shibata, T.; Okamoto, I.; Yuki, Y.; Namikoshi, H.; Toga, Y.; *Chromatographia* **1984**, *19*, 280.
- Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Yamamoto, K.; Hatada, K.; *Chem. Lett.* **1984**, *5*, 739.
- Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5357.
- Shibata, T.; Sei, T.; Nishimura, H.; Deguchi, K.; *Chromatographia* **1987**, *24*, 552.
- <http://www.daiceI.co.jp/chiral/e-home.html>, acessada em Junho 2004.
- <http://www.chiraltech.com>, acessada em Junho 2004.
- Yashima, E.; Okamoto, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 3289.
- Okamoto, Y.; Kaida, Y.; *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 403.
- Steinmeier, H.; Zugenmaier, P.; *Carbohydr. Res.* **1987**, *164*, 97.
- Tachibana, K.; Ohnishi, A.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 127.
- Chankvetadze, B.; Kartoziya, I.; Yamamoto, C.; Okamoto, Y.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 467.
- Tang, Y.; *Chirality* **1996**, *8*, 136.
- Orlando, R.M.; Bonato, P. S.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *795*, 227.
- Kunath, A.; Theil, F.; Jähnisch, K.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 249.
- Persson, B.-A.; Andersson, S.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *906*, 195.
- Okamoto, M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 401.
- Gaitani, C. M.; Lanchote, V. L.; Bonato, P. S.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *708*, 177.
- Ishikawa, A.; Shibata, T.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1993**, *16*, 859.
- Miller, L.; Orihuela, C.; Fronck, R.; Murphy, J.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *865*, 211.
- Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Cassiano, N.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2000**, *23*, 1029.

52. Bonato, P. S.; Bortocan, R.; Gaitani, C. M.; Paías, F. O.; Iha, M. H.; Lima, R. P.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 190.
53. Oliveros, L.; Senso, A.; Minguillón, C.; *Chirality* **1997**, *9*, 145.
54. Oliveros, L.; Senso, A.; Franco, P.; Minguillón, C.; *Chirality* **1998**, *10*, 283.
55. Franco, P.; Senso, A.; Minguillón, C.; Oliveros, L.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *796*, 265.
56. Franco, P.; Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillón, C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 155.
57. Felix, G.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 171.
58. Okamoto, Y.; Noguchi, J.; Yashima, E.; *React. Funct. Polym.* **1998**, *37*, 183.
59. Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillón, C.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *839*, 15.
60. Yamamoto, C.; Hayashi, T.; Okamoto, Y.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1021*, 83.
61. Felix, G.; Zhang, T.; *J. Chromatogr.* **1993**, *639*, 141.
62. Stewart, K. K.; Doherty, R. F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1973**, *70*, 2850.
63. Allenmark, S.; Bomgren, B.; *J. Chromatogr.* **1982**, *252*, 297.
64. Allenmark, S.; Bomgren, B.; Boren, H.; *J. Chromatogr.* **1983**, *264*, 63.
65. Haginaka, J.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *906*, 253.
66. Millot, M. C.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *797*, 131.
67. Karlsson, A.; Aspegren, A.; *Chromatographia* **1998**, *47*, 189.
68. <http://chirbase.u-3mrs.fr/chirbase/database.html>, acessada em Junho 2004.
69. Altria, K. D.; *Capillary electrophoresis guidebook - Principles, operation and applications*, Humana Press: Totowa, 1996.
70. Tavares, M. F. M.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 173.
71. Baker, D. R.; *Capillary Electrophoresis*, Wiley Interscience: New York, 1995.
72. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.; *J. Chromatogr.* **1981**, *218*, 209.
73. Terabe, S.; Otsuka, K.; Nishi, H.; *J. Chromatogr., A* **1994**, *666*, 295.
74. Wistuba, D.; Schurig, V.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *875*, 255.
75. Otsuka, K.; Mikami, C.; Terabe, S.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *887*, 457.
76. Lämmerhofer, M.; Svec, F.; Fréchet, J. M. J.; Lindner, W.; *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 676.
77. Blanco, M.; Valverde, I.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 428.
78. Vescina, M. C.; Fermier, A. M.; Guo, Y.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *973*, 187.
79. Verleysen, K.; Sandra, P.; *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2798.
80. Bressolle, F.; Audran, M.; Pham, T.-N.; Vallon, J.-J.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1996**, *687*, 303.
81. Fanali, S.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *875*, 89.
82. Koppenhoefer, B.; Zhu, X.; Jakob, A.; Wuerthner, S.; Lin, B.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *875*, 135.
83. Fillet, M.; Hubert, P.; Crommen, J.; *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2834.
84. Boer, T.; Zeeuw, R. A.; Jong, G. J.; Ensing, K.; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3220.
85. Stalcup, A. M.; Gahm, K. H.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1360.
86. Zhou, L.; Johnson, B. D.; Miller, C.; Wyvratt, J. M.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *875*, 389.
87. Skanchy, D. J.; Xie, G.-H.; Tait, R. J.; Luna, E.; Demarest, C.; Stobaugh, J. F.; *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2638.
88. Wang, F.; Dowling, T.; Bicker, G.; Wyvratt, J.; *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 378.
89. Jabor, V. A. P.; Lanchote, V. L.; Bonato, P. S.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1406.
90. Jabor, V. A. P.; Bonato, P. S.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1399.
91. Bonato, P. S.; Jabor, V. A. P.; Paías, F. O.; Lanchote, V. L.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 1115.
92. Paías, F. O.; Lanchote, V. L.; Takayanagui, O. M.; Bonato, P. S.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3263.
93. Paías, F. O.; Bonato, P. S.; *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 1063.
94. Jabor, V. A. P.; Lanchote, V. L.; Bonato, P. S.; *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3041.
95. Bonato, P. S.; Paías, F. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 318.
96. Abushoffa, A. M.; Fillet, M.; Servais, A.-C.; Hubert, P.; Crommen, J.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 343.
97. Izumoto, S.-I.; Nishi, H.; *Electrophoresis* **1999**, *20*, 189.
98. Fillet, M.; Hubert, P.; Crommen, J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *875*, 123.
99. Fillet, M.; Chankvetadze, B.; Crommen, J.; Blaschke, G.; *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2691.
100. Gaitani, C. M.; Martínez, A. S.; Bonato, P. S.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2723.
101. Wang, F.; Khaledi, M. G.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *731*, 187.
102. Wang, F.; Khaledi, M. G.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *875*, 277.
103. Bakhtiar, R.; Ramos, L.; Tse, F. L. S.; *Chirality* **2001**, *13*, 63.
104. Bonato, P. S.; Del Lama, M. P. F. M.; Carvalho, R.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *796*, 413.
105. Cherkaoui, S.; Rudaz, S.; Varesio, E.; Veuthey, J.-L.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3308.
106. Schweitz, L.; Petersson, M.; Johansson, T.; Nilsson, S.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *892*, 203.
107. Hempel, G.; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 691.
108. Urbánek, M.; Krivánková, L.; Boček, P.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 466.
109. Kataoka, H.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, *22*, 232.
110. Oliveira, A. R. M.; Cesarino, E. J.; Bonato, P. S.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, no prelo.
111. Andersen, S.; Halvorsen, T. G.; Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.; *J. Chromatogr., A* **2002**, *963*, 303.
112. Huikko, K.; Kostianen, R.; Kotiaho, T.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 149.
113. Schwarz, M. A.; Hauser, P. C.; *J. Chromatogr., A* **2001**, *928*, 225.
114. Rodriguez, I.; Jin, L. J.; Li, S. F. Y.; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 211.
115. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>, acessada em Junho 2004.
116. Fabre, H.; Altria, K. D.; *LCGC* **2001**, *19*, 498.
117. Hartmann, C.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D. L.; McDowall, R. D.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 193.
118. Causon, R.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1997**, *689*, 175.
119. Boulanger, B.; Chiap, P.; Dewe, W.; Crommen, J.; Hubert, P.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *32*, 753.
120. Ducharme, J.; Fernandez, C.; Gimenez, F.; Farinotti, R.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1996**, *686*, 65.
121. Bonato, P. S.; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 4078.
122. Jabor, V. A. P.; Coelho, E. B.; Ifa, D. R.; Bonato, P. S.; Santos, N. A. G.; Lanchote, V. L.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *796*, 429.
123. Gaitani, C. M.; Martínez, A. S.; Bonato, P. S.; *Chirality* **2003**, *15*, 479.
124. Cerqueira, P. M.; Boralli, V. B.; Coelho, E. B.; Lopes, N. P.; Guimarães, L. F. L.; Bonato, P. S.; Lanchote, V. L.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *783*, 433.
125. Papini, O.; Mathes, A. D. S.; Cunha, S. P.; Lanchote, V. L.; *Chirality* **2004**, *16*, 65.
126. Cerqueira, P. M.; Cesarino, E. J.; Bertucci, C.; Bonato, P. S.; Lanchote, V. L.; *Chirality* **2003**, *15*, 542.
127. Takayanagui, O. M.; Bonato, P. S.; Dreossi, S. A. C.; Lanchote, V. L.; *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *54*, 125.
128. Marques, M. P.; Coelho, E. B.; Santos, N. A. G.; Geleilate, T. J. M.; Lanchote, V. L.; *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *58*, 607.
129. Gonçalves, P. V.; Mathes, A. C.; Da Cunha, S. P.; Lanchote, V. L.; *Chirality* **2002**, *14*, 683.
130. Sousa, E. P.; Tiritan, M. E.; Oliveira, R. V.; Afonso, C. M. M.; Cass, Q. B.; Pinto, M. M. M.; *Chirality* **2004**, *16*, 279.
131. Cass, Q. B.; Lima, V. V.; Oliveira, R. V.; Cassiano, N. M.; Degani, A. L. G.; Pedrazzoli, J.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2003**, *798*, 275.
132. Cass, Q. B.; Watanabe, C. S. F.; Rabi, J. A.; Bottari, P. Q.; Costa, M. R.; Nascimento, R. M.; Cruz, J. E. D.; Ronald, R. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 581.
133. Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; Cassiano, N. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 2083.
134. Cass, Q. B.; Batigalha, F.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 445.
135. Santoro, M. I. R. M.; Cho, H. S.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2001**, *27*, 693.
136. Santoro, M. I. R.; Cho, H. S.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 1107.
137. Santoro, M. I. R.; Singh, A. K.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2003**, *26*, 517.