

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise estereosseletiva do cloridrato de *cis*-tramadol e de suas impurezas em matéria-prima e formulação farmacêutica**

Naíssa Prévide Bernardo

Ribeirão Preto

2008

## RESUMO

BERNARDO, N. P. **Análise estereosseletiva do cloridrato de *cis*-tramadol e de suas impurezas em matéria-prima e formulação farmacêutica.** 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2008.

O cloridrato de tramadol, analgésico sintético de ação central, possui dois centros quirais: o isômero *cis* é ativo e o isômero *trans* é uma impureza de processo. Ambos os enantiômeros do cloridrato de *cis*-tramadol contribuem para o efeito analgésico, mas através de mecanismos diferentes, complementares e interativos farmacologicamente. Os dois isômeros do *cis*-tramadol apresentam efeitos terapêuticos, e a presença de impurezas, incluindo os isômeros *trans* - decorrentes do processo de síntese ou devido à decomposição - podem comprometer a qualidade do produto comercializado. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologia estereosseletiva para análise do cloridrato de *cis*-tramadol e das possíveis impurezas quirais ou não na matéria-prima e formulações farmacêuticas. Para a separação e quantificação dos enantiômeros do cloridrato de *cis*-tramadol e das impurezas *trans*-tramadol, 1,2-olefina e 1,6-olefina, foi utilizada a coluna Chiralcel<sup>®</sup> OD-H, fase móvel constituída por hexano (60% e 100% de n-hexano, 1:1, v/v):isopropanol:dietilamina:ácido trifluoracético (99,5:0,5:0,3:0,1, v/v/v/v), na vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 274 nm. A coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD – fase móvel constituída por hexano (60% de n-hexano):etanol absoluto:dietilamina (95:5:0,1, v/v/v), na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda para detecção dos compostos foi de 228 nm – foi utilizada para a separação e quantificação das impurezas O-desmetiltramadol, N-desmetiltramadol e tramadol N-óxido. Os métodos desenvolvidos foram devidamente validados através dos parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo, limite de detecção e limite de quantificação.

Os resultados obtidos na validação mostraram que os métodos são adequados para a determinação do *cis*-tramadol e de suas impurezas na matéria prima e na formulação farmacêutica.

Palavras-chave: enantiômeros do cloridrato de *cis*-tramadol, impurezas, matéria-prima, formulação farmacêutica, cromatografia líquida de alta eficiência, fase estacionária quiral.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Fármacos quirais

A quiralidade é um fenômeno associado à Química, mas que, simultaneamente, manifesta-se principalmente em tudo o que é vivo. De acordo com Burke e Henderson (2002), a quiralidade é uma característica fundamental da natureza e influencia o mundo vivo. Esses autores explicam que estamos sob influência constante da quiralidade durante toda a evolução, como resultado da natureza assimétrica do ambiente; exemplificam que muitas proteínas são formadas por L-aminoácidos enquanto carboidratos são compostos por açúcares naturais, todos D-isômeros. Dessa forma, sistemas receptores biológicos constituem uma complexa estrutura e exibem uma organização espacial específica. Portanto, a quiralidade apresenta um efeito nas interações fármaco-receptor.

De acordo com Matthijs et al. (2004), durante as últimas décadas, quiralidade e estereoisomerismo tornaram-se tópicos importantes na farmacologia. Um conjunto de dados está disponível, reunindo estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos com substâncias quirais pertencentes a diversas classes terapêuticas.

Andersson et al. (2003) e o FDA (2007) relatam que os enantiômeros de um fármaco podem ter interações biológicas distintas e, conseqüentemente, apresentarem diferenças qualitativas e quantitativas nas suas propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, biotransformação e excreção) e nos seus efeitos farmacológicos e toxicológicos. Com isso, consideram-se os enantiômeros como compostos diferentes. Waldeck (1993) e Engman et al. (2003) complementam que essas atividades estereosseletivas são conseqüências de interações com receptores biológicos e enzimas que são altamente específicas, e a

estereosseletividade é mais significativa no metabolismo – devido ao envolvimento do sistema enzimático. Aboul-Enein e Ali (2002) reforçam que as diferenças nas atividades biológicas dos enantiômeros são devidas a diferenças na ligação a proteínas de transporte, no mecanismo de ação, no metabolismo e na eliminação.

As diferenças estereosseletivas na atividade farmacológica de fármacos quirais são divididas em três categorias: na primeira, os dois enantiômeros possuem atividades farmacológicas similares; na segunda, um dos enantiômeros pode ser farmacologicamente ativo e pode ser considerado como o único responsável pelo efeito terapêutico do fármaco; na terceira, os enantiômeros podem ter atividade biológica diferente (BOJARSKI; ABOUL-ENEIN, 1996). Algumas vezes, a atividade biológica pode estar relacionada com apenas um dos enantiômeros enquanto o outro pode ser tóxico, como por exemplo, a talidomida – fármaco no qual um dos enantiômeros apresenta propriedades sedativas e hipnóticas enquanto o outro possui propriedades teratogênicas (BARREIRO; FERREIRA; COSTA, 1997). Porém, em estudos posteriores foi constatada a inversão de configuração da talidomida não apenas *in vitro* mas também *in vivo*, evidenciando que se o enantiômero com propriedades sedativas e hipnóticas tivesse sido administrado puro, seria parcialmente convertido no isômero responsável pelo efeito teratogênico (ERIKSSON et al., 1995; BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

Apesar dessas observações, por razões econômicas e dificuldades de ordem prática nos processos de produção, a maioria dos fármacos quirais obtidos por vias sintéticas são comercializados como racematos, ou seja, misturas contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros. Entretanto o desenvolvimento de medicamentos quirais passou a ter importância concreta a partir de novas diretrizes para registro adotadas a partir de 1992 pelo “Food and Drug Administration” (FDA),

agência governamental dos Estados Unidos (BERMUDEZ; BARRAGAT, 1996; HUTT; VALENTOVÁ, 2003). Não só o FDA mas também outras agências reguladoras da Comunidade Comum Européia e do Japão exigem, atualmente, que para se registrar novos fármacos quirais todos os estudos pré-clínicos sejam realizados com cada enantiômero isoladamente e, além disso, exigem que as propriedades cinéticas e dinâmicas dos enantiômeros isolados sejam estabelecidas (BOJARSKI; ABOUL-ENEIN, 1996; FDA, 2007). Assim, o reconhecimento e a possibilidade de desenvolvimento de estereoisômeros isolados passaram a ser uma abordagem de importância vital para a indústria farmacêutica (BERMUDEZ; BARRAGAT, 1996).

Para fármacos que já são comercializados como racematos observa-se uma tendência denominada “chiral switch” ou “racemic switch”, ou seja, o desenvolvimento de formulações contendo os enantiômeros puros em vez do racemato (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001; HUTT; VALENTOVÁ, 2003).

No Brasil, de acordo com Santoro e Singh (2001), não há uma política ou resolução tratando do desenvolvimento de novos fármacos estereoisoméricos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe das seguintes resoluções para a composição dos relatórios técnicos:

- RDC nº 136, de 29 de maio de 2003, dispõe sobre o registro de medicamentos novos: descreve que dentre as informações técnicas do princípio ativo a serem enviadas para a ANVISA, deve-se relatar possíveis isômeros;
- RDC nº 135, de 29 de maio de 2003, dispõe sobre o registro de medicamentos genéricos: solicita que para o fármaco deve-se enviar dados sobre os teores dos estereoisômeros, no caso de fármacos que apresentam quiralidade cuja proporção de estereoisômeros possa comprometer a eficácia e a segurança do medicamento;

- RDC nº 133, de 29 de maio de 2003, dispõe sobre o registro de medicamentos similares: não consta nada descrito sobre fármacos quirais.

## 1.2 Métodos analíticos enantiosseletivos

Todos os estudos realizados com fármacos quirais estimularam o desenvolvimento de métodos analíticos enantiosseletivos (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005) para serem empregados no controle de qualidade da matéria-prima e formulações farmacêuticas. A presença de impurezas quirais também pode diferir de uma forma enantiomérica para outra, portanto, métodos para a determinação de impurezas também devem ser estereosseletivos.

Além dessa aplicação, os métodos de resolução de fármacos quirais são importantes também para ajudar na avaliação dos parâmetros farmacocinéticos dos isômeros individualmente (CALDWELL, 1995), bem como em processos preparativos visando à obtenção dos enantiômeros puros (MILLER; ORIHEULA; FRONEK, 1999).

Bermudez e Barragat (1996) comentam que para assegurar a qualidade dos produtos, principalmente quando há indicativos de que um determinado isômero é responsável por efeitos colaterais, é necessário empregar técnicas analíticas aplicando métodos mais seletivos e sofisticados, como: cromatografia gasosa (CG); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN); e as medidas cristalográficas utilizando raios-X.

Outros autores colocam que as principais técnicas capazes de fornecer essas informações são baseadas na ciência da separação (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005; BOJARSKI; ABOUL-ENEIN, 1996; HAGINAKA, 2002). Os maiores sucessos

na análise enantiosseletiva têm sido conseguidos por meio do uso da CLAE e de fases estacionárias quirais (FEQ) (ANDERSSON et al., 2003; BOJARSKI; ABOUL-ENEIN, 1996; WANG; CHEN, 1999; PERRIN et al., 2002; OKAMOTO; KAIDA, 1994).

### 1.2.1 Cromatografia líquida com fases estacionárias quirais

Observa-se, desde a década de 70, um grande investimento no desenvolvimento de fases estacionárias quirais e na procura por seletores quirais capazes de exibir enantiosseletividade para um grande número de compostos quirais (ANDERSSON et al., 2003).

Aboul-Enein e Ali (2002) consideram as seguintes fases estacionárias quirais como as mais importantes: fases tipo Pirkle; fases derivadas de polissacarídeos (celulose ou amilose); fases baseadas em ciclodextrinas e seus derivados; fases protéicas; fases do tipo éter de coroa; fases derivadas de antibióticos macrocíclicos; e fases por troca de ligante. Para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos, a literatura destaca o sucesso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos, em proteínas e em antibióticos.

Proteínas como a albumina humana, a bovina, a  $\alpha_1$ - glicoproteína ácida, a proteína ovomucóide, etc, têm sido adequadamente ligadas a um suporte de sílica e empregadas como fases estacionárias quirais. Essas fases apresentam enantiosseletividade para um grande número de compostos permitindo, assim, a análise direta, ou seja, sem necessidade de derivação. Por outro lado, a baixa capacidade, a menor estabilidade das colunas e o limitado entendimento dos



mecanismos de separação são fatores limitantes na utilização dessas fases estacionárias (HAGINAKA, 2001).

Interações altamente seletivas entre certas moléculas e as proteínas no sistema biológico fornecem a base da cromatografia com fases quirais protéicas (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). 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 a presença de aditivos carregados (HAGINAKA, 2001).

Os antibióticos macrocíclicos possuem diversas características que permitem a eles interagirem estereosseletivamente com analitos de diversas formas. Eles têm um elevado número de centros estereogênicos e grupos funcionais, o que permite múltiplas interações com analitos quirais, através de interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo,  $\pi$ - $\pi$ , ligações de hidrogênio, repulsão estérea e, principalmente, interação iônica. Os antibióticos macrocíclicos podem ser ácidos, básicos ou neutros e podem ter pouca ou nenhuma absorvância no Ultravioleta-visível (UV-Vis). Fases estacionárias quirais compostas pelos antibióticos macrocíclicos vancomicina, teicoplanina, ristocetina A, avoparcina, rifamicina B e tiostreptona são usadas em separações quirais por CLAE. Os antibióticos baseados em glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina, ristocetina A e avoparcina) parecem ter uma capacidade enantiosseletiva maior que as ansamicinas ou tiostreptona (WARD; FARRIS, 2001).

As fases estacionárias derivadas de polissacarídeos foram desenvolvidas pelo Prof. Yoshio Okamoto da Universidade de Nagoya e introduzidas pelo seu grupo em 1984. Essas fases são o principal produto da empresa Chiral Technologies

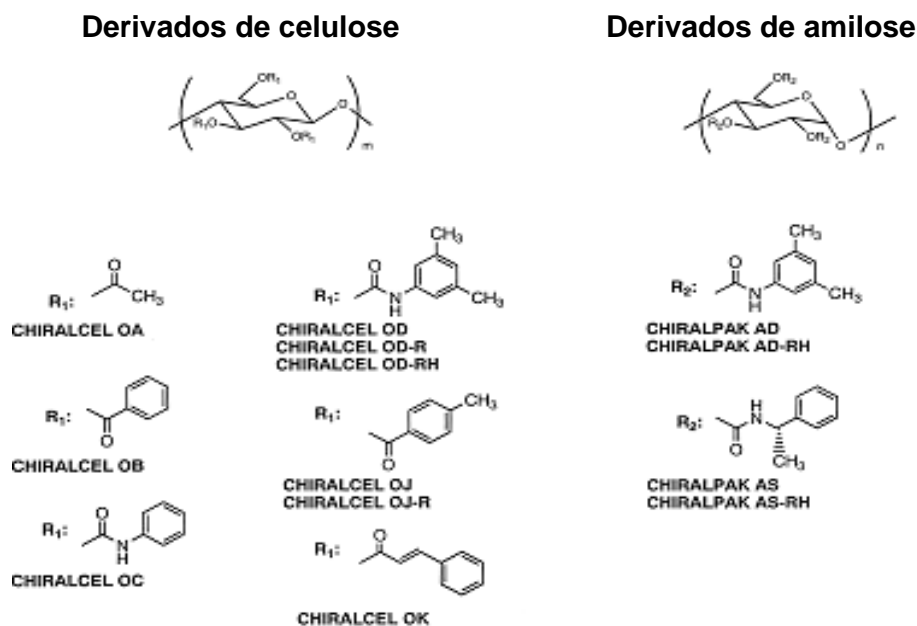
Inc. (ABOUL-ENEIM, 2001; CHIRAL TECHNOLOGIES, 2006). Polissacarídeos como a celulose e a amilose *in natura* apresentam limitada capacidade de resolução quiral. Por outro lado, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados como tris-benzoatos e tris-fenilcarbamatos criando novos sítios para o reconhecimento quiral. Nas fases estacionárias disponíveis comercialmente, os derivados de polissacarídeos encontram-se recobrimo partículas de sílica ou sílica aminopropil usadas como suporte (OKAMOTO; KAIDA, 1994; YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

Nos derivados tris-benzoatos, os grupos carbonila polares dos ésteres podem interagir com os enantiômeros através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Quando o grupo fenil da celulose tris-benzoato é substituído, a habilidade de reconhecimento quiral é grandemente influenciada pelo tipo de grupo introduzido. Os derivados benzoato, tendo substituintes doadores de elétrons como o grupo metil, possuem maior habilidade de reconhecimento quiral quando comparado com substituintes aceptores de elétrons, como halogênios (OKAMOTO; KAIDA, 1994; YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

Nos derivados tris-fenilcarbamatos, os solutos quirais podem interagir através de ligações de hidrogênio com os grupos NH e C=O, e em interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. Interações  $\pi$ - $\pi$  do grupo fenil da fase estacionária podem interagir com grupos aromáticos do soluto (podendo ser menos importantes do que as interações polares), mas elas não podem ser ignoradas, principalmente em separações no modo fase reversa. A habilidade de reconhecimento quiral também é influenciada pelos substituintes do grupo fenil, como por exemplo, grupos metil, etil, halogênios ou NO<sub>2</sub> (OKAMOTO; KAIDA, 1994). Okamoto e Kaida (1994) descrevem ainda que a diferença do reconhecimento quiral dos derivados de celulose e amilose

deve ocorrer por causa da diferente configuração do resíduo de glicose e da diferente estrutura apresentada pelos dois polímeros.

A Figura 1 mostra as estruturas dos polímeros de polissacarídeos e os grupos funcionais das FEQs que estão comercialmente disponíveis. As colunas Chiracel<sup>®</sup> OD (celulose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)), Chiralcel<sup>®</sup> OJ (celulose tris-(4-metilbenzoato)) e Chiralpak<sup>®</sup> AD (amilose tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato)) mostram alta habilidade de discriminação quiral para um grande número de racematos com várias estruturas químicas (ABOUL-ENEIN, 2001; MATTHIJS et al., 2004; PERRIN et al., 2002; OKAMOTO; KAIDA, 1994) e também propriedades complementares (MATTHIJS et al., 2004; PERRIN et al., 2002).



**Figura 1.** Estruturas das FEQs baseadas em derivados de polissacarídeos.

Embora o mecanismo de discriminação quiral com estas fases polissacarídeas não foi satisfatoriamente elucidado, acredita-se que a diferenciação de interação dos enantiômeros é resultado de uma combinação de forças atrativas

como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo e interações por transferência de carga (MAIER; FRANCO; LINDNER, 2001; ABOUL-ENEIN, 2001; ABOUL-ENEIN; ALI, 2002).

As fases estacionárias derivadas de polissacarídeos podem ser empregadas em três modos de eluição: fase normal, fase reversa e polar orgânico (CHANKVETADZE et al., 2002; TACHIBANA; OHNISHI, 2001).

No modo fase reversa as colunas são empregadas com fases móveis compostas por uma solução aquosa e um solvente orgânico miscível, 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 (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

O modo polar orgânico é caracterizado pelo uso de fases móveis contendo 100% de solventes orgânicos polares, como acetonitrila, metanol, etanol, isopropanol, ou ainda misturas desses solventes (MATTHIJS; MAFTOUH; HEYDEN, 2006; CHANKVETADZE et al., 2002). Chankvetadze et al. (2002) complementam que o comportamento da separação nesse sistema depende não apenas da fase móvel e da fase estacionária, mas também da natureza dos compostos separados.

No modo fase normal empregam-se fases móveis compostas de hexano-álcool (normalmente, isopropanol ou etanol) e pequenas quantidades de aditivos básicos e/ou ácidos. Autores relatam que os fatores composição da fase móvel e estrutura do álcool presente na fase móvel afetam, portanto, o desempenho cromatográfico, o tempo de retenção, a seletividade e a ordem de eluição dos compostos. Os aditivos básicos e/ou ácidos são usualmente requeridos na fase

móvel para melhorar a separação e o formato dos picos (PERRIN et al., 2002; PUENTE et al., 2003).

Quando os analitos contem um grupo funcional básico, a dietilamina (DEA) é freqüentemente adicionada à fase móvel para reduzir a assimetria dos picos, mascarando, então, os grupos silanóis residuais da coluna com fase quiral (ANDERSSON et al., 2003; STRINGHAM; LYNAM; LORD, 2004; PERRIN et al., 2002). O ácido trifluoroacético (TFA) é usualmente utilizado na fase móvel para atenuar a ligação dos analitos ácidos, que são freqüentemente retidos em condições de fase normal (ANDERSSON et al., 2003; PERRIN et al. 2002). Andersson et al. (2003) relatam que a adição de aditivos ácido e básico tem sido reportada por produzir melhora significativa na seletividade e resolução dos analitos ionizáveis.

Os modificadores orgânicos polares mais utilizados são etanol e isopropanol – o primeiro é mais polar e isto afeta a polaridade da fase móvel e contribui para um menor tempo de retenção dos analitos. Porém em alguns estudos verificou-se que o tempo de retenção foi maior com o etanol. Wang e Chen (1999) atribuíram o aumento da retenção obtido com o modificador etanol à associação a uma alteração de natureza estérea da coluna com fase quiral.

### **1.3 Cloridrato de tramadol**

O cloridrato de tramadol é um analgésico sintético de ação central – administrado por via oral, retal ou parenteral – com uma eficácia analgésica e uma potência com raio de ação entre opióides fracos e morfina; é utilizado para a prevenção e tratamento de dor moderada a severa em condições aguda e crônica (MATTHIESEN et al., 1998; KRZEK; STAREK, 2004). O tramadol, um opióide

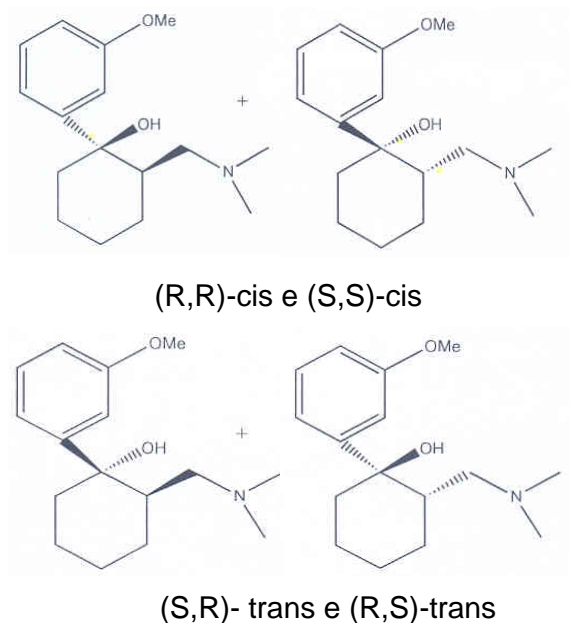
antagonista, mostra afinidade pelos receptores opiáceos  $\mu$ ,  $\sigma$  e  $\kappa$  (KRZEK; STAREK, 2004), interage seletivamente pelos receptores  $\mu$  e fracamente com os receptores  $\sigma$  e  $\kappa$  (KOVELOWSKI; RAFFA; PORRECA, 1998; HERBERT; WEIS; HOLZER, 2007).

O tramadol é um fármaco com dois centros quirais, e o produto comercializado é uma mistura das formas (-)-*cis*-tramadol e (+)-*cis*-tramadol ( $\pm$  *cis*-tramadol) (Figura 2). Ambos os enantiômeros do fármaco contribuem para o efeito analgésico (RAFFA et al. 1992; RAFFA et al., 1993), mas através de mecanismos diferentes, complementares e interativos farmacologicamente. O enantiômero (+) possui uma maior ação como agonista opióide fraco, devido a sua maior afinidade pelos receptores  $\mu$ , e é mais efetivo em inibir a recaptção de serotonina (NOBILIS et al., 2002); demonstra-se, então, que este isômero é 10 vezes mais ativo (CHAN; HO, 1998; CECCATO et al., 2000). O enantiômero (-) é um inibidor mais efetivo da recaptção de noradrenalina e aumenta sua liberação por ativação de autoreceptores (NOBILIS et al., 2002).

O tramadol (*cis*-tramadol), dentro do organismo, é amplamente biotransformado no fígado (HERBERT; WEIS; HOLZER, 2007) em vários metabólitos, principalmente, no ( $\pm$ )-O-desmetiltramadol, que apresenta ter de duas a quatro vezes a potência do *cis*-tramadol em ratos (CHAN; HO, 1998) e duzentas vezes mais afinidade pelos receptores opiáceos (HERBERT; WEIS; HOLZER, 2007).

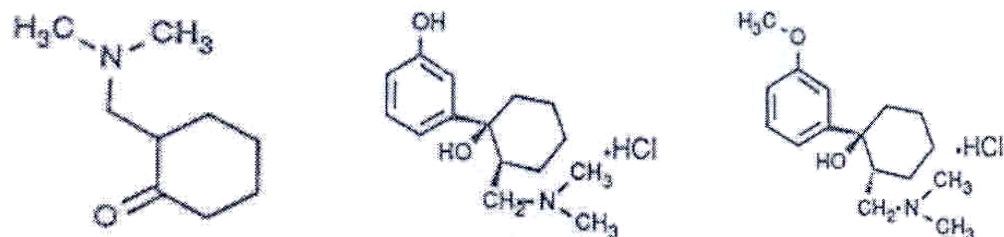
Embora os dois isômeros do *cis*-tramadol apresentem efeitos terapêuticos, a presença de impurezas quirais, incluindo os isômeros *trans* decorrentes do processo de síntese ou devido à decomposição, podem comprometer a qualidade do produto comercializado. No dossiê da empresa, essas impurezas estão descritas como impurezas de processo e produtos de degradação. A Figura 3 mostra as estruturas

das impurezas de processo e, na Figura 4, estão representados os compostos de degradação.

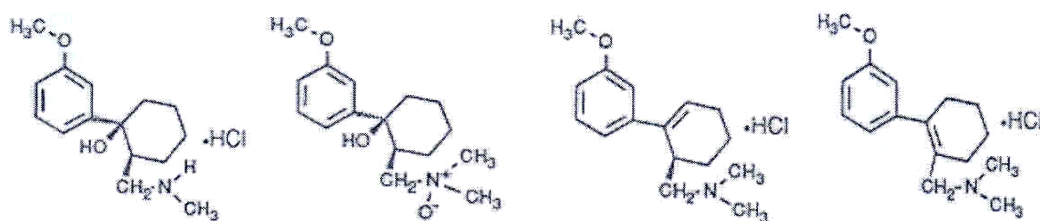


**Figura 2.** Estruturas dos isômeros *-cis* e *-trans* do cloridrato de tramadol.

O *cis*-tramadol tem a sua monografia oficial na Farmacopéia Européia 5.0 (ZECEVIC et al., 2006). De acordo com Medvedovici et al. (2004) e Zecevic et al. (2006), a segunda etapa da rota de síntese do cloridrato de *cis*-tramadol consiste na adição da base de Mannich ao 3-bromoanisol de magnésio e resulta na formação da impureza 2-[(dimetilamino) metil] ciclohexanona (DMAC). Essa impureza pode representar um potencial produto de degradação da desalquilação oxidativa do *cis*-tramadol e sua quantificação é mandatória no controle de qualidade de matérias-primas e produtos acabados. Juzwin et al. (2000) relatam que o análogo N-óxido (de acordo com o dossiê da empresa, tramadol N-óxido é um composto de degradação) do analgésico central *cis*-tramadol é um novo agente terapêutico e é investigado pelo R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute para o tratamento de desordem obsessiva-compulsiva.



**Figura 3.** Estruturas das impurezas de processo: DMAC, O-desmetiltramadol e isômero *trans*.



**Figura 4.** Estruturas dos compostos de degradação: N-desmetiltramadol, tramadol N-óxido, 1,6 olefina e 1,2 olefina.

De acordo com a literatura pesquisada, alguns trabalhos relatam a análise de impurezas ou a realização de estudos de estabilidade em formulações ou, na matéria-prima (WAGNER et al., 2003; JOHNSON et al., 2004; MEDVEDOVICI et al., 2004; ZECEVIC et al., 2006), entretanto, nenhum desses métodos é estereosseletivo. Além disso, esses estudos não reportam qualquer degradação nas formulações farmacêuticas e nas matérias-primas.

No trabalho de Zecevic et al. (2006), os autores descrevem o desenvolvimento de um método por CLAE não estereosseletivo para análise das impurezas *trans*-tramadol, 1,2-olefina e 1,6-olefina – descritas na Farmacopéia Européia. O método foi empregado para a avaliação de tramadol e dessas impurezas em formulações que continham sorbato de potássio e sacarina sódica.



Não há trabalhos citados, na literatura, que relatem a pesquisa ou o desenvolvimento de métodos para a análise das impurezas N-desmetiltramadol e tramadol N-óxido.

A análise enantiosseletiva é descrita apenas para o *cis*-tramadol e seus principais metabólitos, principalmente, o O-desmetiltramadol e, nesse caso, os métodos são direcionados para análise em fluidos biológicos. Campanero et al. (2004) empregaram a coluna Chiralcel<sup>®</sup> OD-R e fase móvel constituída por tampão fosfato 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 2,5, contendo perclorato de sódio (1 mol L<sup>-1</sup>):acetonitrila:N,N-dimetiloctilamina (74,8:25:0,2), para a análise enantiosseletiva de *cis*-tramadol, O-desmetiltramadol e N-desmetiltramadol em plasma. Ceccato et al. (2000) utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para análise enantiosseletiva do tramadol e de seu metabólito ativo O-desmetiltramadol em plasma. A separação foi conseguida empregando a coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD e fase móvel constituída por hexano:etanol:dietilamina (97:3:0,1, v/v/v).

A análise não esterosseletiva de *cis*-tramadol e de seus metabólitos em plasma foi descrita por Ardakani e Rouini (2007); a separação foi conseguida na coluna Chromolith<sup>®</sup> Performance RP18e 100 mm x 4,6 mm com coluna guarda Chromolith<sup>®</sup> RP18e 5 mm x 4,6 mm e empregando fase móvel constituída pela mistura de metanol:água (19:81, v/v) com o pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico. Outros autores também descrevem a análise não esterosseletiva em plasma (GU; FAWCETT, 2005; ROUINI et al., 2006; ARDAKANI et al., 2008; CURTICAPEAN et al., 2008) e cabelo (HADIDI et al. (2003).

Outra técnica analítica é a eletroforese capilar, empregada para análise enantiosseletiva do *cis*-tramadol (GUO et al., 1998), bem como de seus metabólitos (CHAN; HO, 1998; RUDAZ et al., 1999).

#### 1.4 Validação de métodos analíticos

A RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos – descreve que o objetivo de uma validação é garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando sua apropriação para a finalidade pretendida e a confiabilidade dos resultados.

Neste trabalho, a finalidade é a determinação quantitativa do fármaco cloridrato de *cis*-tramadol e de suas impurezas de processo e degradação tanto para a matéria-prima quanto para a formulação farmacêutica. Esse tipo de estudo se enquadra na categoria II da Tabela 1 da RE nº 899. As normas de validação da Janssen-Cilag também serão seguidas para a complementação de alguns dados e critérios de aceitação.

O Quadro 1 apresenta os parâmetros analíticos que devem ser seguidos para validação de um método que se enquadra na categoria II – quantitativo.

Parâmetro	Definição
Seletividade	Capacidade de medir exatamente um dos compostos na presença de interferentes do placebo e das impurezas
Limite de detecção (LD)	Menor concentração que pode ser detectada (apenas para as impurezas)
Limite de quantificação (LQ)	Menor concentração que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis
Linearidade	Faixa de concentração com relação linear entre concentração e resposta
Exatidão	Proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro
Intervalo	Faixa entre os limites de quantificação superior e inferior
Repetibilidade	Precisão intra-corrída: variação dos resultados em um curto período de tempo, com o mesmo analista e instrumentação
Precisão intermediária	Precisão inter-corrídas: variação dos resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes

**Quadro 1.** Parâmetros empregados na validação do método.

O parâmetro seletividade, conforme descrito no Quadro 1, serve para avaliar se não há picos interferentes dos componentes da matriz e de impurezas da formulação. Observa-se se não há coeluição entre os picos.

A linearidade do método para análise do componente ativo é avaliada usando, no mínimo, cinco concentrações diferentes analisadas em triplicata (70%, 85%, 100%, 115% e 130%). Os critérios de aceitação incluem a obtenção de coeficientes de correlação ( $r$ ) maiores ou iguais a 0,99. Para cada ponto do início, meio e fim, o desvio padrão relativo deve ser menor ou igual a 2,0% e a recuperação

deve ser de 97,0% a 103,0%, com valor médio de 98,0% a 102,0% (ANVISA, 2003; PSGA-DOC-1695, 2006).

A linearidade do método de análise das impurezas é avaliada com no mínimo cinco concentrações diferentes analisadas em triplicata (0,5%, 0,75%, 1,0%, 1,25%, 1,5%, 1,75% e 2,0%). O coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser maior ou igual a 0,99. Para cada ponto do início, meio e fim, a estimativa do desvio padrão relativo deve ser menor ou igual a 25,0% e a recuperação deve estar na faixa de 60,0 a 140,0%, com valores médios de 70,0% a 130,0% (PSGA-DOC-1695, 2006).

A estimativa do LD pode ser feita com base na relação sinal/ruído = 3. Para determinar o LQ, a razão sinal/ruído deve ser aproximadamente 10, a estimativa do desvio padrão relativo menor ou igual a 25,0% e a média das recuperações deve estar entre 50,0 e 150,0% (PSGA-DOC-1695, 2006).

Para métodos de teor e pureza, a precisão é avaliada preparando-se seis replicatas de amostras fortificadas com as impurezas e uma amostra sem fortificação (esta amostra é preparada para avaliar se houve degradação). A análise é realizada em uma seqüência, no mesmo dia. Já a precisão intermediária é realizada em mais de um dia. A diferença absoluta das médias entre os dois dias deve ser menor ou igual a 3,0 % e a estimativa do desvio padrão relativo ( $n=12$ ) menor ou igual a 2,0% para o composto ativo; para as impurezas, a diferença relativa das médias entre os dois dias deve ser menor ou igual a 40,0% e a estimativa do desvio padrão relativo ( $n=12$ ) menor ou igual a 15,0% (PSGA-DOC-1695, 2006).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no desenvolvimento desse trabalho podem ser considerados bastantes satisfatórios, já que a metodologia empregada permitiu a análise estereosseletiva do cloridrato de *cis*-tramadol, bem como de seis impurezas, i.e, 1,2-olefina e 1,6-olefina, *trans*-tramadol, O-desmetiltramadol, N-desmetiltramadol, tramadol-N-óxido. Vale ressaltar que não há métodos relatados na literatura para análise estereosseletiva do tramadol e suas impurezas.

Apesar da importância dos métodos aqui descritos, cumpre lembrar que não foi possível obter a resolução simultânea do ativo (*cis*-tramadol) e de todas essas impurezas em uma mesma coluna cromatográfica. Além disso, a ordem de eluição dos estereoisômeros não pode ser estabelecida até o momento, o que nos levou a identificar os isômeros dos diferentes compostos como 1 e 2.

A separação dos estereoisômeros do tramadol e das impurezas 1,2-olefina e 1,6-olefina (MÉTODO 1) foi otimizada na coluna Chiralcel<sup>®</sup> OD-H usando como fase móvel a mistura hexano (60% de n-hexano e 100% de n-hexano (1:1, v/v):isopropanol:DEA:TFA (99,5:0,5:0,3:0,1; v/v/v/v), na vazão de 0,7 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 274 nm. O volume injetado foi de 50 µL e realizaram-se as análises a 20 °C. Obteve-se a resolução das impurezas O-desmetiltramadol, N-desmetiltramadol e tramadol N-óxido (MÉTODO 2) empregando a coluna Chiralpak<sup>®</sup> AD, com detecção no comprimento de onda 228 nm, volume de injeção 100 µL e fase móvel constituída por hexano (60% de n-hexano):etanol:DEA (95:5:0,1, v/v/v) na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. Durante a realização dos experimentos de otimização da fase móvel, verificou-se a influência dos diferentes tipos de hexano empregados na composição das fases móveis. Esse efeito ainda não havia sido descrito na literatura.

Otimizou-se o procedimento de preparação das amostras de matéria-prima e da formulação farmacêutica. No que concerne à matéria-prima, após a dissolução na fase móvel, foi necessário submeter as amostras ao ultra-som durante 30 minutos, seguido de agitação no vórtex por cinco minutos. Para a formulação farmacêutica empregou-se agitação de 30 minutos no ultra-som, após os primeiros 15 minutos utilizou-se o vórtex por 5 minutos e, ao final, usou-se o vórtex pelo mesmo tempo.

Após o desenvolvimento do procedimento de separação e de extração os MÉTODOS 1 e 2 para análise dos estereoisômeros do cloridrato de tramadol e das impurezas, na matéria-prima e na formulação farmacêutica foram validados. As validações seguiram a Resolução nº 899 da ANVISA e as normas da empresa Janssen-Cilag PSGA-DOC-1695 e PSGA-DOC-1707. Os parâmetros avaliados nas validações dos MÉTODOS 1 e 2 – seletividade, linearidade, repetibilidade, exatidão, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação e precisão intermediária – mostraram resultados aceitáveis perante todos os critérios estabelecidos.

## 6. REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, H. Y. High-performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 906, p. 185-93, 2001.

ABOUL-ENEIN, H. Y.; ALI, I. Optimization strategies for HPLC enantioseparation of racemic drugs using polysaccharides and macrocyclic glycopeptide antibiotic chiral stationary phases. **IL Farmaco**, Pavia, v. 57, p. 513-29, 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 133, de 29 de maio de 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 135, de 29 de maio de 2003.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC nº 136, de 29 de maio de 2003.

ANDERSSON, M. E.; ASLAN, D.; CLARKE, A.; ROERAADE, J.; HAGMAN, G. Evaluation of generic chiral liquid chromatography screens for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1005, p. 83-101, 2003.

ARDAKANI, Y. H.; ROUINI, M. Improved liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tramadol and its three main metabolites in human plasma, urine and saliva. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 44, p. 1168-73, 2007.

ARDAKANI, Y. H.; MEHVAR, R.; FOROUMADI, A.; ROUINI, M. Enantioselective determination of tramadol and its main phase I metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 864, p. 109-15, 2008.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente pura (SEP): a questão dos fármacos quirais. **Química Nova**, São Paulo, v. 20 (6), p. 647-56, 1997.

BERMUDEZ, J. A. Z.; BARRAGAT, P. Medicamentos quirais: da dimensão química à dimensão política. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 12 (1), p. 47-51, 1996.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 28 (4), p. 683-91, 2005.

BOJARSKI, J.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Recent applications of chromatographic resolution of enantiomers in pharmaceutical analysis. **Biomedical Chromatography**, Chichester, v. 880, p. 563-76, 2002.

BURKE, D.; HENDERSON, D. J. Chirality: a blueprint for the future. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, v. 10, p. 297-302, 1996.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drug metabolism. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 694, p. 39-48, 1995.

CAMPANERO, M. A.; GARCIA-QUETGLAS, E.; SÁBADA, B.; AZANZA, J. R. Simultaneous stereoselective analysis of tramadol and its primary phase I metabolites in plasma by liquid chromatography. Application to a pharmacokinetic



study in humans. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1031, p. 219-28, 2004.

CECCATO, A.; VANDERBIST, F.; PABST, J. Y.; STEEL, B. Enantiomeric determination of tramadol and its main metabolite O-desmethyltramadol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 748, p. 65-76, 2000.

CHAN, E. C. Y.; HO, P.C. Enantiomeric separation of tramadol hydrochloride and its metabolites by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 707, p. 287-94, 1998.

CHANKVETADZE, B.; KARTOZIA, I.; YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide-type chiral stationary phases using polar organic mobile phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 467-78, 2002.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista Farmacêutica e Bioquímica da São Paulo**, São Paulo, v. 30 (2), p. 41-6, 1994.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 11 (1), p. 1-6, 1998.

CHIRAL TECHNOLOGIES. **Laboratory products and services for chiral analysis and separation**: catálogo. Pensilvânia (West Chester), 2006. 16 p. il.

CURTICAPEAN, A.; MUNTEAN, D.; CURTICAPEAN, M.; DAGARU, M.; VARI, C. Optimized HPLC method for tramadol and O-desmethyl tramadol determination in

human plasma. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam v. 70, p. 1304-12, 2008.

ENGMAN, H; TANNERGREN, C.; ARTURSSON, P.; LENNERNÄS, H. Enantioselective transport and CYP3A4-mediated metabolism of R/S-verapamil in Caco-2 cell monolayers. **European Journal of Pharmaceutical Science**, Amsterdam, v. 19, p. 57-65, 2003.

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

EUROPEAN PHARMACOPEIA 6.0 VOLUME 2. Strasbourg Cedex, França. ISBN 978-92-871-6054-6.

EVANS, G. R.; HENSILWOOD, J. A.; O'ROURKE, J. Highly efficient resolution of ( $\pm$ )-Tramadol with di-p-toluoyl-tartaric acid (DTTA). **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v. 12, p. 1663-70, 2001.

GUO, W.; ZHAN, Q.; ZHAO, Y.; WANG, L. Determination of cis and trans isomers of tramadol hydrochloride by capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, Chichester, v. 12, p. 13-14, 1998.

HADIDI, K. A.; ALMASAD, J. K.; AL-NSOUR, T.; ABU-RAGHEIB, S. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC-MS. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 135, p. 129-36, 2003.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using liquid chromatographic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 27, p. 357-72, 2002.

HAGINAKA, J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 906, p. 253-73, 2001.

HERBERT, M. K.; WEIS, R.; HOLZER, P. The enantiomers of tramadol and its major metabolite inhibit peristalsis in the guinea pig small intestine via differential mechanisms. **BMC Pharmacology**, London, v. 7, p. 1-11, 2007.

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

JOHNSON, C. E.; WAGNER, D. S.; DELOACH, S. L.; CICHON-HENSLEY, B. K. Stability of tramadol hydrochloride-acetaminophen (Ultracet) in strawberry syrup and sugar-free vehicle. **American Society of Health-System Pharmacists**, Bethesda, v. 7, p. 61-54, 2004.

JUZWIN, S.J.; WANG, D.C.; ANDERSON, N.J.; WONG, F.A. The determination of RWJ-38705 (tramadol N-oxide) and its metabolites in preclinical pharmacokinetic studies using LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 22, p. 469-480, 2000.

KOVELOWSKI, C.J.; RAFFA, R.B.; PORRECA, F. Tramadol and its enantiomers differentially suppress c-fos-like immunoreactivity in rat brain and spinal cord following acute noxious stimulus. **European Journal of Pain**, London, v. 2, p. 211-9, 1998.

KRZEK, J.; STAREK, M. Quality assessment for tramadol in pharmaceutical preparations with thin layer chromatography and densitometry. **Biomedical Chromatography**, Chichester, v. 18, p. 589-99, 2004.

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

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

MATTHIESEN, T.; WÖHRMANN, T.; COOGAN, T. P.; URAGG, H. The experimental toxicology of tramadol: an overview. **Toxicology Letters**, Missouri, v. 95, p. 63-71, 1998.

MATTHIJS, N.; PERRIN, C.; MAFTOUH, M.; MASSART, D. L.; VANDER-HEYDEN, Y. Definition and system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal- or reversed-phase liquid chromatography using polysaccharide-based stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1041, p. 119-33, 2004.

MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; HEYDEN, Y. V. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals IV. Polar organic solvent chromatography. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1111, p. 48-61, 2006.

MEDVEDOVICI, A.; ALBU, F.; FARCA, A.; DAVID, V. Validated HPLC determination of 2-[(dimethylamino)methyl]cyclohexanone, na impurity in Tramadol, using a precolumn derivatisation reaction with 2,4-dinitrophenyl hydrazine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 34, p. 67-74, 2004.

MILLER, L.; ORIHUELA, C.; FRONEK, R. Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 849, p. 309-17, 1999.

NOBILIS, M.; KOPECKY, J.; KVETINA, J.; CHLÁDEK, J.; SVODOBA, Z.; VORISEK, V.; PERLIK, F.; POUR, M.; KUNES, J. High-performance liquid chromatography determination of tramadol and its O-desmethylated metabolite in blood plasma. Application to a bioequivalence study in humans. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 949, p. 11-22, 2002.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high-performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 666, p. 403-19, 1994.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 37, p. 1020-43, 1998.

PERRIN, C.; VU, V. A.; MATTHIJS, N.; MAFTOUH, M.; MASSART, D. L.; VANDER HEYDEN, Y. Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part I. Normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 947, p. 69-83, 2002.

PUENTE, M. L.; WHITE, C. T.; RIVERA-SAGREDO, A.; REILLY, J.; BURTON, K.; HARVEY, G. Impact of normal-phase gradient elution in chiral chromatography: a novel, robust, efficient and rapid chiral screening procedure. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 983, p. 101-14, 2003.

Procedimento operacional padrão da Companhia Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. **System Suitability Procedure for HPLC, GC, IC & UV/Vis Methods**. Número do documento: PSGA-DOC-1707-revisão 1.0, de 22 de janeiro de 2003.

Procedimento operacional padrão da Companhia Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda. **Guideline for the validation of HPLC methods**. Número do documento: PSGA-DOC-1695-revisão 3.0, de 31 de janeiro de 2006.

RAFFA, R. B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an “atypical” opioid. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 260, p. 275-85, 1992.

RAFFA, R. B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L.; JACOBY, H. I.; SELVE, N. Complementary and synergistic antinoceptive interaction between the enantiomers of tramadol. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 267, p. 331-40, 1993.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27 (5), p. 771-80, 2004.

RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L.; DESIDERIO, C.; FANALI, S. Simultaneous stereoselective analysis by capillary electrophoresis of tramadol enantiomers and their main phase I metabolites in urine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 846, p. 227-37, 1999.

SANTORO, M. I. R. M.; SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37 (3), p. 259-68, 2001.

SHAO, L.; ABOLIN, C.; HEWITT, M.C.; KOCH, P.; VARNEY, M. Derivates of tramadol for increased duration of effect. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdam, v. 16, p. 691-94, 2006.

STRINGHAM, R. W.; LYNAM, K. G.; LORD, B. S. Memory effect of diethylamine mobile phase additive on chiral separations on polysaccharide stationary phases. **Chirality**, New York, v. 16, p.493-98, 2004.

TACHIBANA, K.; OHNISHI, A. Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 906, p. 127-54, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs**. Rockville, 2007.

USP/NF 2.SUPPLEMENT. Rockville, EUA. 1820-. Anual. ISSN 0195-7996.

WAGNER, D. S.; JOHNSON, C. E.; CICHON-HENSLEY, B. K; DELOACH, S. L. Stability of oral liquid preparations of tramadol in strawberry syrup and sugar-free vehicle. **American Society of Health-System Pharmacists**, Bethesda, v. 60, p. 1268-70, 2003.

WALDECK, B. Biological significance of the enantiomeric purity of drugs. **Chirality**, New York, v. 5, p. 350-55, 1993.

WANG, T.; CHEN, Y. W. Application and comparison of derivatized cellulose and amylose chiral stationary phases for the separation of enantiomers of pharmaceutical compounds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 855, p. 411-21, 1999.

WARD, T. J.; FARRIS, A. B. Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 906, p. 73-89, 2001.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 68, p. 3289-307, 1995.

ZECEVIC, M.; STANKOVIC, Z.; ZIVANOVIC, L.;JOCIC, B. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of

tramadol and its impurities in oral drops as a pharmaceutical formulation. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1119, p. 251-6, 2006.