

SOTALOL: DOSAGEM PLASMÁTICA DOS ISÔMEROS (+) E (-) -R- SOTALOL POR HPLC COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA: APLICAÇÃO EM ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS.

Luiz Carlos da Cunha, Silvia Regina C. J. Santos, Isabel Cristina Medeiros Barros,
Fernando A. A. Gondim, Ângelo Amato Vincenzo de Paola.

AN IMPROVED HPLC-FLUORESCENCE STEREOSELECTIVE METHOD FOR ANALYSIS OF (+)-S- AND (-)-R-SOTALOL ENANTIOMERS IN PLASMA SAMPLE

Endereço para correspondência:

Dr. Luiz Carlos da Cunha - Rua 4, nº 76, Q. 8, L. 3 - Setor Moraes
Goiânia-GO - CEP: 74620-395 - Fone/Fax: (62) 261 3999

RESUMO

Desenvolveu-se técnica simplificada em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação dos enantiômeros do sotalol em amostras de plasma para estudar a disposição cinética estereosseletiva em pacientes miocardiopatas portadores de taquiarritmia sob polifarmacoterapia e regime de dose múltipla com racemato de sotalol. Após adição de NaCl:Na₂CO₃ (4:1) ao plasma e precipitação das proteínas por acetonitrila:metanol (1:1), o sobrenadante foi evaporado e o resíduo contendo racemato de sotalol foi submetido a derivatização com (-)-mentilclorofornato para formação dos diastereoisômeros R(-) e S(+)-sotalol. Os diastereoisômeros foram resolvidos em HPLC, coluna C₁₈ com detecção fluorescente sob $\lambda_{\text{excitação}} = 235 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 310 \text{ nm}$. Os tempos de retenção para R- e S-sotalol foram 20 e 22 minutos, enquanto que para o padrão interno, S(-)-atenolol, foi de 17 minutos. Conseguiu-se limite de detecção para cada enantiômero de 12,5 ng/mL. Os coeficientes de variação intra-dia e inter-dia foram menores que 10%, para cada enantiômero, sob concentrações de 200 e 2000 ng/mL. O método mostrou-se adequado para a finalidade proposta.

Financiamento e apoio: CAPES-PICD / Fundação Zerbini

Palavras-chaves: R,S-sotalol, R-sotalol, S-sotalol, análise, isômero, enantiômero, diastereoisômero, racemato, estereosseletividade, HPLC, disposição cinética, taquiarritmia.

ABSTRACT

A simplified high performance chromatographic method (HPLC) was performed for sotalol enantiomers in plasma samples for investigation purposes of the kinetic disposition of racemic sotalol in cardiac arrhythmic patients under multiple dose and multidrug therapy regimens. After addition of NaCl:Na₂CO₃ (4:1) and plasma protein precipitation by acetonitrile:methanol mixture (1:1) the supernatant was evaporated. The residue containing sotalol racemate was submitted to derivatization reaction with (-)-menthylchloroformate to R(-) and S(+)-sotalol diastereoisomers. The diastereoisomers were resolved in HPLC, by a C₁₈ column with fluorescent detection under $\lambda_{\text{excitation}} = 235 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emission}} = 310 \text{ nm}$. The retention times for R- and S-sotalol were 20 and 22 minutes while of that internal standard S(-)-atenolol, was 17 minutes. The detection limit for each enantiomer was 12.5 ng/mL and intra-day / inter-day coefficients of variation were less than 10% for each enantiomer within a concentration range of 200 and 2000 ng/mL. The method was appropriate for the objective proposed.

Supported by CAPES-PICD / Fundação Zerbini

Key words: R,S-sotalol, R-sotalol, S-sotalol, analysis, isomer, enantiomer, diastereoisomer, racemate, stereoselectivity, HPLC, kinetic disposition, tachycardia.

INTRODUÇÃO

No passado, quase todos os pacientes recebiam doses iguais da maioria dos fármacos. Tal prática levava a grande variação na intensidade do efeito. Descobriu-se que esta variação era inerente à variabilidade inter-paciente na eliminação do fármaco, levando à necessidade de monitorização das concentrações plasmáticas do mesmo (Controle Terapêutico) para mantê-la dentro de um “nível ou faixa terapêuticos”, admitindo-se flutuações (pico e vale) entre as doses⁷.

Atualmente questiona-se sobre a validade de continuar com a prática de monitorar o nível plasmático total (soma dos dois isômeros) e calcular os parâmetros cinéticos para o racemato (mistura equimolecular de dois enantiômeros) ou se devemos quantificar os isômeros separadamente. Outro desafio em voga é estabelecer quais fármacos devem ser comercializados na forma do isômero puro^{7,29}.

Os enantiômeros descobertos por Pasteur, apresentam quase todas as propriedades físico-químicas iguais, diferindo em algumas delas, como o ponto de fusão, o grau de desvio da luz polarizada (direita/esquerda, dextrógiro/levógiro, +/-), a configuração absoluta, algumas propriedades organolépticas e o comportamento em ambiente quiral^{3,31}.

Aproximadamente 25% de todos os fármacos sintéticos e naturais prescritos e dispensados são racematos¹⁷. Dentre os fármacos sintéticos com centro quiral, cerca de 88%⁷ são comercializados na forma racêmica, enquanto por volta de 98% dos fármacos de origem natural (e.g.; quinidina) são biossintetizados e comercializados na forma enantiomérica pura^{2,8}.

Dentre os fármacos antiarrítmicos, boa parte é comercializada sob a forma de racematos, destacando-se os agentes β -bloqueadores adrenérgicos (propranolol, acebutolol, pindolol, atenolol, metoprolol, sotalol), o verapamil, a tocainida, a mexiletina, a propafenona e a disopiramida, para os quais foram reportadas estereosseletividade farmacocinética e/ou farmacodinâmica^{7,20}.

Considerando os fármacos antiarrítmicos detentores de estereosseletividade farmacodinâmica e com potencial para estereosseletividade farmacocinética, além da importância no arsenal terapêutico, esco-lhemos, para desenvolvimento de protocolo de pesquisa em farmacocinética, o fármaco β -bloqueador R,S-sotalol^{14,15,32}.

O sotalol é um antagonista β -adrenérgico não-seletivo, destituído de atividade simpatomimética intrínseca, atividade estabilizadora de membrana e cardiosseletividade, sendo enquadrado nos

grupos II e III da classificação de Vaughan-Williams^{14,27,28} e recentemente introduzido como antiarrítmico no mercado. É utilizado na Clínica sob forma de racemato, constituído pela mistura equimolecular de dois enantiômeros, R(-) e S(+)-sotalol, cloridratos hidrossolúveis^{11,13,22} sendo que o R-sotalol é fármaco essencialmente β -bloqueador (50-60 vezes mais potente que S(+)-sotalol), enquanto o S-sotalol possui predominantemente atividade antiarrítmica Classe III. Em consequência destas ações, observa-se o prolongamento do intervalo QT e a diminuição da frequência cardíaca dose-dependentes, sendo importantes indicadores de efeito e segurança no uso terapêutico do R,S-sotalol^{12,33}. A estereosseletividade farmacocinética tem sido pesquisada e discutida, com resultados conflitantes e inconclusivos^{5,6,10,25}.

Os métodos analíticos utilizados são todos em cromatografia líquida de alta eficiência, empregando derivatizantes quirais e carecem de melhor resolução, rapidez e praticidade (diminuição do número de etapas).

Com o intuito de aprimorar ou desenvolver um método que resultasse em características mais favoráveis para estudos da disposição cinética dos enantiômeros do sotalol em pacientes sob regime de dose múltipla, propusemo-nos a desenvolver o presente trabalho.

EXPERIMENTAL

Reagentes e padrões

Todos os reagentes, produtos químicos e solventes utilizados apresentaram pureza para cromatografia líquida. Na preparação de soluções-tampão e na regeneração do cromatógrafo líquido, utilizou-se água ultrapura obtida através de deionização (impedância de 18,2 M Ω) e micro-filtração em equipamento Milli-Q®, da Waters-Millipore™.

Os sais cloreto de sódio e carbonato de potássio, Merck pró-análise foram previamente lavados em diclorometano e secos em estufa a 70 °C. Devido às suas propriedades de pares iônicos, foram utilizados com finalidade de aumentar a força iônica do meio e melhorar o rendimento da extração por solvente orgânico.

Preparou-se, diariamente e imediatamente antes do uso, solução de (-)-mentilcloroformato [(-)-MCF] Sigma-Aldrich p.a. (Código 37871-2), a 4% (v/v) em acetonitrila. A derivatização do sotalol (amina secundária) (**Figura 1**) possui melhor rendimento quando executada em meio aquoso e alcalino, o que foi obtido pela adição de solução saturada de carbonato de sódio, Merck p.a.

A fase móvel, constituída por tampão fosfato

triácido 0,05 M pH 4,7: metanol: acetonitrila (35:35:30) e desgaseificada em banho de ultra-som sob vácuo, foi preparada diariamente.

As seguintes soluções-padrão foram preparadas: SOTALOL - SOLUÇÃO-PADRÃO ESTOQUE (1 mg/mL de R,S-sotalol em água ultrapura) e SOLUÇÕES-PADRÃO DE USO, correspondente aos padrões alto (50 µg/mL), médio (25 µg/mL) e baixo (5 µg/mL), para serem adicionados às amostras de plasma 20 µL atingindo concentrações plasmáticas correspondentes a 2000 ng/mL, 1000 ng/mL e 200 ng/mL, respectivamente; PADRÃO INTERNO: SOLUÇÃO-ESTOQUE aquosa de S(-)-atenolol (Sigma-Aldrich Co) de 1 mg/mL e SOLUÇÃO-USO de 50 µg/mL, tendo sido utilizados 10 µL desta solução em cada amostra analisada, atingindo a concentração de 1000 ng/mL por amostra plasmática. As soluções, quando armazenadas em freezer a -20°C, foram estáveis por pelo menos 6 meses.

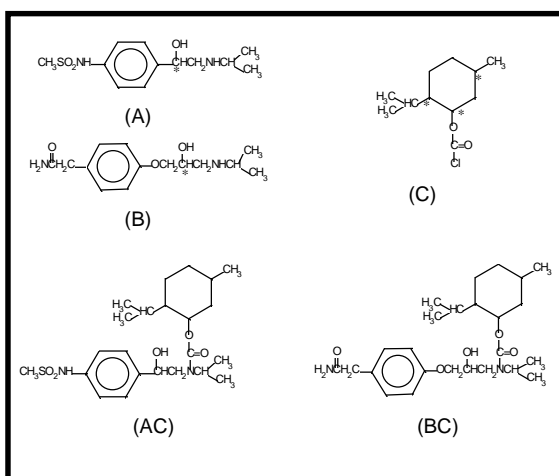


Figura 1. Reação do R,S-sotalol (A) e do S(-)-atenolol (B) com (-)-mentil-clorofornato [(-)-MCF] (C) em meio aquoso e alcalino, resultando em seus respectivos derivados clorofornatados [AC] e [BC]. São formados duas espécies de derivados do sotalol, sendo um correspondente à configuração R e o outro à S. Os asteriscos indicam os carbonos quirais^{9,18}.

Curva de calibração e validação do método analítico

Determinaram-se os intervalos de confiança da técnica analítica empregada: linearidade, sensibilidade, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio, CV%) e recuperação relativa. Construíram-se curvas de calibração para os isômeros S- e R-sotalol à partir de solução-padrão estoque 1 mg/mL do racemato, em plasma humano livre do fármaco (branco de plasma), de forma a se obter concentrações na faixa compreendida entre 50 e 2000 ng/mL para cada enantiômero. A fase

móvel foi desgaseificada sob vácuo através de banho de ultra-som. As análises diárias através de cromatografia líquida de alta eficiência envolveram: preparação de curva de calibração (padrões em triplicata), controles de qualidade interno (triplicata) e amostras dos pacientes, (duplicata).

Efetou-se controle de qualidade para aceitação ou não dos resultados analíticos registrados rotineiramente^{21,24,30} com o intuito de aumentar a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados analíticos.

Preparação da amostra

A tubos de vidro 10 mL, descontaminados com diclorometano, adicionou-se 100 mg de NaCl:Na₂CO₃ (4:1 p/p), seguida de 500 µL de plasma em duplicata (branco e amostra) ou triplicata (padrões e controle de qualidade). Após acrescentar 10 µL de padrão interno S(-)-atenolol 50 µg/mL, a mistura foi agitada em vórtex por 20s, seguida de 2 min de repouso. Na sequência, precipitou-se as proteínas plasmáticas com 1,0 mL de solução de acetonitrila:metanol (1:1) agitando-se em vórtex por 1min20s, seguida de centrifugação a 3000 rpm, 5°C por 20 min (centrifugador HITACHI, himac CF 7D).

O sobrenadante resultante foi decantado em tubos cônicos de vidro de 10 mL, sendo submetido à evaporação em BM 37 °C sob fluxo de N₂ gasoso. Ao resíduo assim obtido acrescentou-se 100 µL de solução saturada de Na₂CO₃. Após homogeneização em vórtex durante 20s, adicionou-se 100 µL da solução do derivatizante (-)-MCF a 2,5% (v/v), agitando em vórtex por 20s para derivatização dos enantiômeros do sotalol. Acrescentou-se 1,0 mL de H₂O ultrapura, com agitação em vórtex 20s, seguida por 5 min de repouso.

A esta mistura aquosa adicionou-se 2 mL de diclorometano (para extrair os diastereoisômeros de R e S-sotalol, produto lipossolúvel), agitou-se por 1min20s em vórtex e centrifugou-se a 3000 rpm, 5°C, 20min. Após decantação do sobrenadante (fase aquosa), a fase orgânica foi imersa em cilindro de N₂ líquido, congelando os traços de água. A fase orgânica anidra foi transferida para tubo cônico de vidro de 15 mL, previamente descontaminado com diclorometano e evaporada em BM 37 °C / N₂.

O resíduo derivatizado resultante foi armazenado em freezer a -20 °C e, no dia seguinte, dissolvido em 50 µL de fase móvel, injetando-se 20 µL no sistema cromatográfico, para obtenção dos cromatogramas no integrador. Todas as etapas do método analítico são mostradas à Figura 2.

Condições cromatográficas

As amostras foram analisadas à temperatura ambiente utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) constituído por cromatógrafo SHIMADZU LC-6A, isocrático, equipado com injetor RHEODYNE® (loop de 20 µL), detector de fluorescência SHIMADZU RF-535 sob $\lambda_{\text{excitação}} = 235 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 310 \text{ nm}$, tendo acoplado a este sistema o integrador CR-6A DA SHIMADZU. A resolução dos derivados diastereoisoméricos foi obtida através da eluição em coluna de fase reversa NovaPak® C₁₈ (15cm x 3,9 mm, 4 µm d.i.). A fase móvel foi bombeada sob fluxo de 0,6 mL/min.

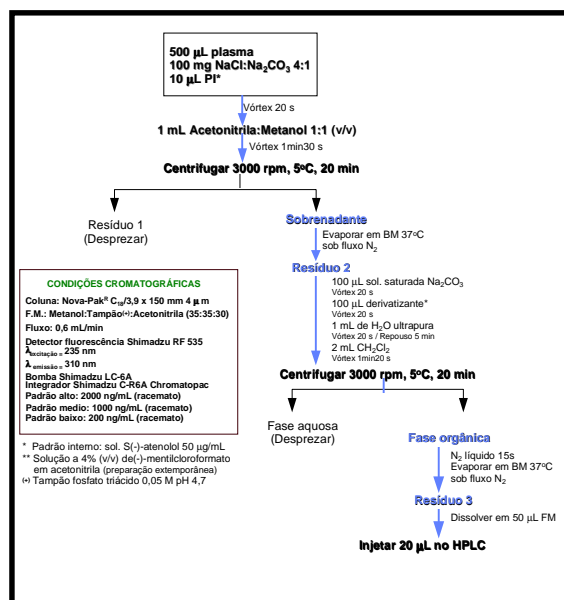


Figura 2. Fluxograma das etapas do procedimento extrativo para análise dos isômeros R- e S-sotalol em amostras de plasma.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseando-se em técnicas analíticas cromatográficas descritas anteriormente para quantificação dos enantiômeros do sotalol^{4,9,10,17,25}, atenolol^{18,19} e propranolol²³, desenvolveu-se método alternativo com número de etapas reduzido, envolvendo derivatização pós-coluna estereoespecífica com (-)-mentilcloroformato.

Os cromatogramas típicos dos derivados diastereoisoméricos dos enantiômeros do sotalol e do S(-)-atenolol em plasma são apresentados à Figura 3. Os tempos de retenção para os derivados de R(-) e S(+)-sotalol foram 20 e 22 min, respectivamente, enquanto que o do padrão interno foi de 17 min. A ordem de eluição foi determinada baseando-se na literatura, quando condições cromatográficas similares foram utilizadas.

Como pode ser observado à Figura 3, obteve-se resolução completa ($R \approx 1,5$) dos enantiômeros após derivatização com o reagente homoquiral (-)-mentilcloroformato, (-)-MCF, contrastando com MEHVAR e cols., 1993a que obtiveram resolução parcial com este reagente e ligeiramente superior à resolução obtida por Fiset e cols., 1989a.

A resolução dos enantiômeros do sotalol também foi conseguida empregando-se os derivados isotiocianatos GITC (2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-arabinopiranosil isotiocianato)²⁶ e AITC (2,3,4-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil isotiocianato). Quando foram utilizados isotiocianatos evidenciaram-se picos de compostos endógenos e reagentes interferentes no cromatograma, próximos aos picos dos isômeros do sotalol e do padrão interno, o que não ocorre quando se utiliza o derivatizante (-)-MCF. O aumento de resolução e a ausência de interferência ocorre também em consequência do uso do detector de fluorescência, que apresenta alta seletividade quando comparado ao de UV⁹.

Outros autores^{4,25} conseguiram boa resolução cromatográfica dos enantiômeros do sotalol empregando os derivados isocianatos S(-)- α -metilbenzil isocianato e o S(+)-1-(1-naftil)etil isocianato. No primeiro caso, evidenciou-se eluição de interferentes próxima aos picos dos enantiômeros, além da exigência de derivatização por período de 12 horas. A utilização do reagente S(+)-1-(1-naftil)etil isocianato possibilitou boa resolução na análise cromatográfica dos enantiômeros derivatizados, mas apresentou sensibilidade cerca de 5 vezes menor quando comparado à análise dos mesmos produtos derivados com o (-)-mentilcloroformato de nossa técnica^{9,25}.

Sendo o sotalol um fármaco anfotérico com pKa 8,80 e 9,80, a extratibilidade máxima ocorre em pH alcalino, em torno de 9,0^{9,16}. Com o procedimento extrativo utilizado nesta técnica, a recuperação dos enantiômeros do sotalol à partir de 500 µL de plasma foi > 83% (85 ± 3% para R-sotalol e 83 ± 4% para o S-sotalol). A extração não é estereosseletiva e nem ocorre racemização⁹.

O fármaco β -bloqueador S(-)-atenolol foi escolhido como padrão interno por ser, como o sotalol, hidrofílico, possuindo, nas condições cromatográficas apresentadas, boa separação dos picos do sotalol e apresentar boa intensidade de fluorescência, além de formar diastereoisômero com o (-)-MCF^{9,17}.

Os cloroformatos reagem quase instantaneamente com aminas e álcoois, para produzir carbamatos e carbonatos, respectivamente^{9,17}. Para assegurar que o (-)-MCF reagiria apenas com

o grupamento amina do sotalol e do S(-)-atenolol, a reação foi desenvolvida em presença de água e solução saturada de carbonato de sódio. Sob condições não controladas de pH, dois diastereoisômeros serão produzidos para cada enantiômero do sotalol e atenolol^{1,9,17}.

A eficiência da reação independe do tempo (30s - 1 h) e da temperatura (25 - 50 °C)^{9,17}. Não se sabe se a reação é completa. Entretanto, através dos dados de MEHVAR e cols., 1989a, verificamos que a derivatização com S(-)-atenolol é completa após 30 s. Devido à similaridade com o sotalol, inferimos que a derivatização deste deve ser completa.

O limite de detecção (razão sinal de ruído/linha de base 3:1), superior ao observado sob detecção UV, foi de 12,5 ng/mL e o limite de quantificação (razão sinal de ruído/linha de base 5:1) foi de 25 ng/mL para cada enantiômero¹⁶.

A reprodutibilidade, avaliada pelos coeficientes de variação (CV%) inter e intra-ensaio foi menor que 10%, como pode ser observado na Tabela I.

Tabela I. Precisão inter-ensaio e intra-ensaio para a concentração plasmática do R(-)- e do S(+)-sotalol, avaliada através do CV%.

Concentração (ng/mL)	Coeficiente de variação % (média ± DP, n = 5)	
	R(-)-sotalol	S(+)-sotalol
Variabilidade intra-ensaio		
200	7,1 ± 0,5	6,2 ± 0,6
2000	5,2 ± 0,4	4,8 ± 0,3
Variabilidade inter-ensaio		
200	8,0 ± 0,7	7,0 ± 0,6
2000	7,0 ± 0,8	6,5 ± 0,6

Recordando que o nosso objetivo foi desenvolver uma técnica analítica estereosseletiva para estudos farmacocinéticos após administração do sotalol em pacientes, demonstramos, à Figura 4, que a concentração plasmática dos isômeros do sotalol podem ser determinadas com facilidade em paciente recebendo comprimidos de cloridrato de sotalol sob regime de dose múltipla p.o. de 160 mg cada 12 h. Nesta paciente não foi observada tendência acentuada à estereosseletividade. Devido à alta sensibilidade, o método é também adequado para estudo da farmacocinética de dose única do sotalol^{9,10,22}.

Os pacientes cardíacos que se submeterão à investigação de estereosseletividade dos enantiômeros do sotalol, além de estarem sob terapia crônica com este fármaco, geralmente recebem co-administração de outros medicamentos, devendo-se certificar se o método é seletivo em relação a estes possíveis interferentes exógenos (e a outros, estrutural ou fisicoquimicamente semelhantes ao sotalol). Amostras de plasma foram adicionadas de alíquotas (corres-

pondentes a concentrações terapêuticas) de: ácido acetil salicílico, propranolol, pindolol, procainamida + N-acetilprocainamida, amiodarona + desetilamiodarona, captopril, hidroclorotiazida, furosemida, dipirona e digoxina, sendo que nenhum deles interferiu na análise dos enantiômeros, mesmo estendendo a corrida cromatográfica acima de 60 minutos, demonstrando a elevada seletividade do método.

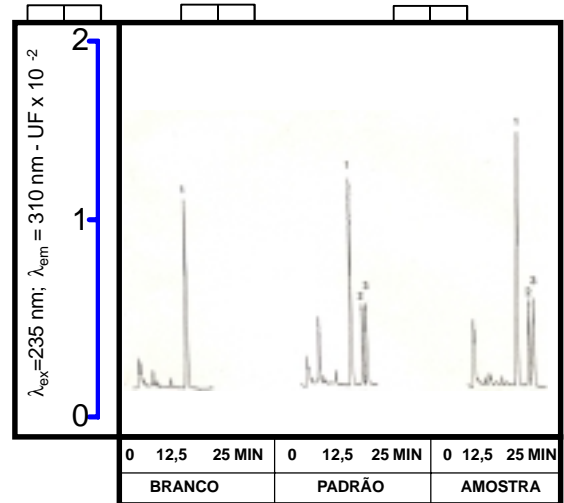


Figura 3. Perfil cromatográfico dos isômeros R- e S-sotalol em plasma: branco, padrão (1000 ng/mL) e amostra (paciente sob tratamento com sotalol 160 mg p.o. 12/12 h). **PICOS:** (1) S(-)-ATENOLOL [17min], (2) R-SOTALOL [20 min], (3) S-SOTALOL [22] min

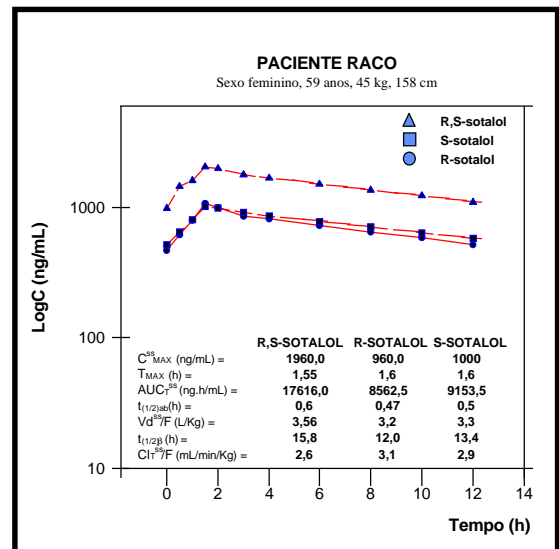


Figura 4. Curva de decaimento plasmático do R,S-, R- e S-sotalol em uma paciente cardíaca crônica portadora de arritmia ventricular sob tratamento em regime de dose múltipla com comprimidos de cloridrato de sotalol (160 mg p.o. 12/12 h). Os principais parâmetros cinéticos são ilustrados na tabela inclusa.

CONCLUSÃO

Descrevemos uma técnica analítica em HPLC altamente seletiva, sensível, com reduzido número de etapas e de baixo custo, podendo ser desenvolvida em condições rotineiras para quantificação dos enantiômeros do sotalol no plasma. Esta técnica é adequada para estudos de farmacocinética tanto em pacientes sob regime de dose múltipla ou dose única, inclusive sob poli-farmacoterapia. Pode ser aplicada, também, com finalidade de monitorização terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. Ahnoff, M., Chen, S., Green, A. And Grundevik, I.. Chiral chloroformates as transparent reagents for the resolution of metoprolol enantiomers by reversed-phase liquid chromatography, v. 503, p. 594-599, 1990.
02. Ariens, E. J., Wuis, E. W. And Veringa, E. J. Stereoselectivity of Bioactive Xenobiotics, *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, nº 1, p. 9-18, 1988.
03. Caldwell, J. The importance of stereoselectivity in drug action and disposition. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 32, p. 925-929, 1992.
04. Carr, R.A., Foster, R.T., Bhanji, N.H. Stereospecific high-performance liquid chromatographic assay of sotalol in plasma. *Pharm. Res.*, v. 8, n. 9, p. 1195-1198, 1991a.
05. Carr, R.A. & Foster, R.T. Enantiospecific Study of Sotalol in Rats. *Pharm. Res.*, v. 8, n. 10, S-265, Suppl., Oct., 1991b.
06. Carr, R.A., Foster, R.T., Lewanczuk, R.Z. And Hamilton, P.G.. Pharmacokinetics of Sotalol Enantiomers in Humans. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 32, p. 1105-1109, 1992.
07. Drayer, D.E. Problems in therapeutic drug monitoring: the dilemma of enantiomeric drugs in man. *Ther. Drug Monitoring*, v. 10, p. 1-7, 1988.
08. Eichelbaum, M. Side effects and toxic reactions of chiral drugs: A clinical perspective, *Arch. Toxicology Suppl.* 17, in Eurotox Congress, Switzerland Aug. 21-24, p.514-521, 1994.
09. Fiset, C., Philippon, F., Gilbert, M. And Turgeon, J. Stereoselective high-performance chromatographic assay for the determination of sotalol enantiomers in biological fluids. *J. Chrom.*, v. 612, p. 231-237, 1993a.
10. Fiset, C., Philippon, F., Gilbert, M. And Turgeon, J. Stereoselective disposition of (\pm)-sotalol at steady-state conditions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 36, p. 75-77, 1993b.
11. Foster, R.T. & Carr, R.A.. Sotalol, in *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Academic Press Inc., 1992. v. 21, p. 501-533.
12. Funk-Brentano, C., Silberstein, D.J., Roden, D.M., Wood, A.J.J. And Woosley, R. L.. A mechanism of d(+)-sotalol effects on heart rate not related to beta adrenoceptor antagonism. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, v. 30, p. 195-202, 1990.
13. Gluth, W.P., Sorgel, F., Gluth, B., Braun, J. And Gelmacher-V. Mallinckrodt. Determination of sotalol in human body fluids for pharmacokinetic and toxicokinetic studies using high-performance liquid chromatography., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* v. 38 (I), n. 3, p. 408-411, 1988.
14. Hanyok, J. J.. Clinical Pharmacokinetics of Sotalol. *Am. J. Cardiol.*, v. 72, p. 19A-26A, 1993.
15. Hardman, J.G., Limbird, L. E., Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A. G., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Edition. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 839-874.
16. Knoll, J.E. Estimation of limit detection in chromatography. *J. Chrom. Sci.*, v. 23, p. 422-425, 1985.
17. Mehvar, R.. Stereospecific liquid chromatographic analysis of racemic adrenergic drugs utilizing precolum derivatization with (-)-menthyl chloroformate. *J. Chrom.* v. 493, p. 402-408, 1989a.
18. Mehvar, R. Liquid chromatography analysis of atenolol enantiomers in human plasma and urine. *J. Pharm. Science* v. 78, n. 12, p. 1035-1039, 1989b.
19. Mehvar, r., Gross, m. and Kreamer, R.Nn. Pharmacokinetics of atenolol enantiomers in humans and rats. *J. Pharm. Sci.*, v. 79, p. 881-885, 1990.
20. Nerurkar, S.G., Dighe, S.V. And Willians, R.L. Bioequivalence of Racemic Drugs. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 32, p. 935-943, 1992.
21. Peng, G.W., Chiou, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. *J. Chrom.*, v. 531, p. 3-50, 1990.
22. Poirer, J. M., Le Jeunne, C., Cheymol, G., Cohen, A., Barré, J. And Hugues, F. C. Comparison of Propranolol and Sotalol Pharmacokinetics in Obese Subjects. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 42, p. 344-348, 1990.

23. Prakash, C., Koshakji, R.P., Wood, A.J.J. And Blair, I.A.. Simultaneous determination of propranolol enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Sci.*, v. 78, n. 9, p. 771-775, 1989.
24. Quattrocchi, O. A., Andrizzi, S. A. & Laba, R. F. *Introducción a la HPLC - Aplicación y Práctica. Edição Merck. Buenos Aires, Argentina: Artes Gráficas Farro SA, 1992. 422 p.*
25. Sallustio, B.C., Morris, R.G. And Horowitz, J.D.. High-performance liquid chromatographic determination of sotalol in plasma. *J. Chrom.*, v. 576, p. 321-327, 1992.
26. Sedman, A.J. And Gal, J.. Resolution of the enantiomers of propranolol and other beta-adrenergic antagonists by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, v. 278, p. 199-203, 1983.
27. Singh, B.N., Deedwania, P., Nademanee, K., Ward, A. And Sorkin, E.M.. Sotalol, a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use. *Drugs*, v. 34, p. 311-349, 1987.
28. Singh, B.N.. Historical development of the concept of controlling cardiac arrhythmias by lengthening repolarization: Particular reference to sotalol. *Am. J. Cardiol.*, v. 65, p. 3A-11A, 1990.
29. Testa, B. Substrate and Product Stereoselectivity in Monooxygenase-Mediated Drug Activation and Inactivation, *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, nº 1, p. 85-92, 1988.
30. Vanbel, P., Tilquin, B.L., Schoenmakers, P.J. Criteria for developing rugged high-performance liquid chromatographic methods. *J. Chrom.*, v. 697, p. 3-16, 1995.
31. Wainer, I. W., Three-dimensional view of pharmacology, *Am. J. Hosp. Pharm.* v. 49, Suppl. 1, p. S4-S8, Sept. 1992.
32. Wang, T., Bergstrand, R. H., Thompson, K. A., Siddoway, L. A., Duff, H. J., Woosley, R. L. And Roden, D. M.. Concentration-Dependent Pharmacologic Properties of Sotalol. *Am. J. Cardiol.* v. 57, p. 1160-1165, 1986
33. Woosley, R. L.; Barbey, J. T.; Wang, T. And Funk-Brentano, C. Concentration/Response Relations for the Multiple Antiarrhythmic Actions of Sotalol. *Am. J. Cardiol.* v. 65, p. 22A-27A, 1990.