UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise enantiosseletiva da zopiclona, suas impurezas e metabólitos em formulações farmacêuticas e materiais biológicos

Milena Araújo Tonon

*Versão corrigida da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 05/04/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise enantiosseletiva da zopiclona, suas impurezas e metabólitos em formulações farmacêuticas e materiais biológicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Milena Araújo Tonon

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Tonon, Milena Araújo
Análise enantiosseletiva da zopiclona, suas impurezas e metabólitos em formulações farmacêuticas e material biológico. Ribeirão Preto, 2012.
167 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientadora: Bonato, Pierina Sueli.

1. Zopiclona. 2. Metabólitos e impurezas. 3. Análise enantiosseletiva. 3. Material biológico. 4. Formulações farmacêuticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Milena Araújo Tonon
Análise enantiosseletiva da zopiclona, suas impurezas e metabólitos em formulações farmacêuticas e materiais biológicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus pais Tadeu e Rute, meu irmão Matheus e ao meu querido Ricardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo amor incondicional, pela vida, por todos os milagres que realizas na minha vida, por todas as pessoas maravilhosas que conheci, por me carregar no colo nas horas mais difíceis. Por me fazer enxergar, a cada dia, o arco íris da vida mesmo quando rodeada pela neblina dos problemas. *"Ser Feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história", "Senhor que sempre seja feita a Sua vontade".*

Aos **meus pais Tadeu e Rute e meu irmão Matheus** pelo amor. Amor eterno e incondicional. Família unida no amor. Vencemos as batalhas juntos, vivenciamos todos os milagres de Deus com fé e gratidão. Vocês são meu apoio, meu exemplo, minha fortaleza. Obrigada meus eternos amores. Obrigada por cada abraço de retorno ou despedida, por cada ida à rodoviária, por acreditarem em mim, por sempre me apoiarem, enfim por serem a família que eu tanto amo.

Ao meu querido **Ricardo** pelo amor, apoio e compreensão. Obrigada por estar sempre comigo nos momentos perfeitos e nas horas mais difíceis. Ao cogitar retornar a Ribeirão Preto para mais essa etapa você me olhou nos olhos e disse *"Eu tenho orgulho de você, você é capaz, vai e conquista esse seu sonho"*. Obrigada por acreditar em mim. Você é um presente de Deus na minha vida.

Agradeço a **Profa. Pierina**, pelo privilégio em ser sua orientada. Agradeço pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual, pela dedicação ao trabalho e oportunidade de convívio com pessoas maravilhosas. Muito obrigada!

Aos amigos pós-graduandos do CROEC, **Anderson, Fernando, Igor, Keyller, Leandro, Patrícia, Thiago, Rodrigo** pelos bons momentos, ajuda, troca de experiências, discussões e conhecimento.

Aos colegas funcionários do CROEC, **Luciana, Roberto e Valquíria** pela amizade e suporte para a execução deste projeto.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** pela possibilidade de desenvolver este projeto.

Aos **funcionários da Secretaria da Pós-graduação**. Obrigada por toda ajuda prestada, pela amizade, convivência. Em especial à Eleni e Rosana pela convivência desde o primeiro ano da minha pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica, **Warley e Denise** e às funcionárias **Aurea e Cláudia** pela amizade e bons momentos durante a minha graduação e pós-graduação.

Aos **amigos do GOU e GPP**, vocês constituem a minha família de Ribeirão Preto. Família formada no amor de Deus. Pessoas lindas que tive o imenso prazer em conhecer. Em especial aos amigos de GOU com os quais tive o prazer de conviver desde meu primeiro ano de faculdade, Alexandre, Ana Paula, Anderson, Carol, Carolzinha, César, Daniel, Fernanda, Gisele, Ivan, Marluce, Michele, Paula, Regiane, Valéria, Valquíra, Vinicius, Wilson.

A **equipe de organização do IV SINPOSPQ**. Obrigada pelo trabalho de todos da equipe. Mais que coordenar a organização desse evento, esse tempo que passamos juntos conheci pessoas maravilhosas, com garra e vontade de viver. Obrigada por cada vitória que juntos conquistamos.

À dona **Evanira**, funcionária da FCFRP-USP. Obrigada pelos cafés, abraços e sábias palavras. Quando o medo, a incerteza, a tristeza bateram à minha porta eu corri com a desculpa de tomar um café para ouvir palavras sábias de uma pessoa maravilhosa e repleta do amor de Deus. Obrigada pelos conselhos, "puxões de orelha": "*Menina onde está a sua fé? Pede para Maria passar na frente! Você acha que Deus te proporia algo se você não fosse capaz? Você vai desistir agora que já está quase no final da escalada, cadê a sua força?*" Que Deus abençoe sempre a senhora.

À **empresa Arrow Farmacêutica LTDA** (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) pelo medicamento fornecido que tornou possível o desenvolvimento desse projeto.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa** (CNPq) pelo auxílio financeiro e bolsa concedida durante a realização do doutorado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

“Suba o Primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas de o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

TONON, M. A. **Análise enantiosseletiva da zopiclona, suas impurezas e metabólitos em formulações farmacêuticas e materiais biológicos.** 2012. 167f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Zopiclona (ZO) é um hipnótico não-benzodiazepínico da classe ciclopirrolonas, indicada para o tratamento da insônia. A ZO é um fármaco quiral administrada como uma mistura racêmica; no entanto, a sua atividade farmacológica está principalmente relacionada com o enatiômero (+)-(S)-ZO, também conhecido como eszopiclona. A ZO é extensivamente metabolizada e os metabólitos principais são a N-desmetil zopiclona (N-Des) e zopiclona-N-óxido (N-Ox). A N-Ox também é uma impureza encontrada na matéria prima. Além dessa impureza, outras oriundas do processo de síntese ou devido à degradação também podem ser encontradas: impureza B (RP29307), impureza C (2-amino-5-cloropiridina, ACP ou RP26695) e RP 48497. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver métodos de análise enantiosseletiva da ZO, metabólitos e impurezas em formulações farmacêuticas e materiais biológicos. Um método empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (LC-MS-MS) foi desenvolvido e validado para a quantificação simultânea da ZO e de seus metabolitos em plasma de ratos. Os analitos foram isolados das amostras por extração líquido-líquido e separados na coluna CHIRALPAK AD-RH, empregando a fase móvel constituída por etanol:metanol:acetonitrila (50:45:5, v/v/v) mais 0,025 % de dietilamina, na vazão de 1,0 mL min^{-1}. A moclobemida foi utilizada como padrão interno. O método desenvolvido foi linear no intervalo de concentração plasmática de 7,5-500 ng mL^{-1}. As recuperações médias absolutas foram de 74,6 e 75,7; 61,6 e 56,9; 72,5 e 70,7 % para os enantiômeros da ZO, N-Des e N-Ox, respectivamente, e 75,9 % para o padrão interno. A precisão e a exatidão apresentaram resultados dentro de níveis aceitáveis (<15 %). A aplicação do método em um estudo piloto de disposição cinética da ZO em ratos mostrou que os níveis de (+)-(S)-ZO foram sempre superiores aos de (-)-(R)-ZO. Concentrações mais elevadas também foram observadas para (+)-(S)-N-Des e (+)-(S)-N-Ox, confirmando a disposição cinética estereosselectiva da ZO. Outro método desenvolvido utilizando LC-MS-MS permitiu a determinação da ZO no cérebro de ratos. O tratamento das amostras foi realizado empregando a extração em fase sólida, obtendo-se recuperações elevadas de 89,6 e 91,7 % para cada enantiômero. Os enantiômeros foram separados em uma coluna CHIRALPAK AD, com a fase móvel constituída por acetonitrila:etanol:metanol (60:20:20, v/v/v), na vazão de 1,3 mL min^{-1}. A moclobemida também foi utilizada como padrão interno. O método validado mostrou linearidade no intervalo de 0,29-344,8 ng g^{-1}, com limite de quantificação de 0,29 ng g^{-1}. Pôde-se observar que os níveis de (+)-(S)-ZO, o enantiômero mais ativo, foram sempre superiores aos de (-)-(R)-ZO. Finalmente, um terceiro método foi desenvolvido para análise enantiosseletiva da ZO e das suas impurezas N-Ox e ACP em comprimidos, empregando a eletroforese capilar com detecção UV (CE-UV). Os analitos foram extraídos dos comprimidos utilizando acetonitrila e foram separados em um capilar não revestido de sílica fundida (50 um, 42 cm de comprimento efetivo, 50 cm de comprimento total), utilizando tampão fosfato de sódio 80 mmol L^{-1}, pH 2,5, contendo 5 mmol L^{-1} de β-ciclodextrina carboximetilada. Os analitos e o padrão

interno (trimetropina) foram detectados em 305 e 200 nm, respectivamente. Uma tensão de 27 kV foi aplicada e a temperatura do capilar foi mantida em 25 °C. Todos os analitos foram analisados em até 8 min e as curvas analíticas foram lineares no intervalo de concentração de 0,4-0,8 mg mL^{-1} para cada enantiômero da ZO, 0,8-1,6 µg mL^{-1} para ACP e 0,4-0,8 $µg^{-1}$ mL para cada enantiômero da N-Ox. Os coeficientes de variação e erros relativos obtidos na avaliação da precisão e exatidão foram inferiores a 2% para todos os analitos. Este método validado foi utilizado para estudar a degradação e racemização da ZO sob condições de stress. As duas impurezas avaliadas foram formadas nas condições de estresse mas a racemização não foi observada.
.

Palavras-chave: Zopiclona, metabólitos e impurezas. análise enantiosseletiva, material biológico, formulações farmacêuticas .

ABSTRACT

TONON, M. A. **Enantioselective analysis of zopiclone, its impurities and metabolites in pharmaceutical formulations and biological materials.** 2012. 167f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Zopiclone (ZO) is a non-benzodiazepine hypnotic drug of the cyclopyrrolone class, indicated for the treatment of insomnia. ZO is a chiral drug administered as a racemic mixture, however its pharmacological activity is mainly related to (+)-(S)-ZO, also known as eszopiclone. It is extensively metabolized and the main metabolites are N-desmethyl zopiclone (N-Des) and zopiclone-N-oxide (N-OX). N-Ox is also found as an impurity in the raw material. Other impurities, coming from the synthetic procedure or due to degradation can also be found: impurity B (RP29307), impurity C (2-amine-5-chloropyridine, ACP or RP26695) and RP 48497. Therefore, the aim of this study was the development of methods for the enantioselective analysis of ZO, metabolites and impurities in pharmaceutical formulations and biological materials. A high-performance liquid chromatographic method with triple quadrupole mass spectrometry detection (LC-MS-MS) was developed and validated for the simultaneous quantification of ZO and its metabolites in rat plasma samples. The analytes were isolated from rat plasma by liquid-liquid extraction and separated using a CHIRALPAK AD-RH column, and ethanol:methanol:acetonitrile (50:45:5, v/v/v) plus 0.025 % diethylamine as mobile phase, at a flow-rate of 1.0 mL min^{-1}. Moclobemide was used as internal standard. The developed method was linear over the concentration range of 7.5-500 ng mL^{-1}. The mean absolute recoveries were 74.6 and 75.7; 61.6 and 56.9; 72.5 and 70.7 % for ZO enantiomers, for N-Des enantiomers and for N-Ox enantiomers, respectively, and 75.9 % for the internal standard. Precision and accuracy were within acceptable levels of confidence (<15 %). Method application in a pilot study of ZO kinetic disposition in rats showed that the levels of (+)-(S)-ZO were always higher than those of (-)-(R)-ZO. Higher concentrations were also observed for (+)-(S)-N-Des and (+)-(S)-N-Ox. Another method was developed for the determination of ZO in rat brain using LC-MS-MS. The sample treatment procedure was carried out employing solid-phase extraction yielding recoveries of 89.6 and 91.7 % for each ZO enantiomer. The ZO enantiomers were resolved on a CHIRALPAK AD column with a mobile phase consisting of acetonitrile:ethanol:methanol (60:20:20, v/v/v) at a flow rate of 1.3 mL min^{-1}. Moclobemide was used as internal standard. The validated method showed linearity in the range of 0.29 - 344.8 ng g^{-1}, with quantification limit of 0.29 ng g^{-1}. It could be observed that the levels of (+)-(S)-ZO were always higher than those of (-)-(R)-ZO. Finally, a third method was developed for the enantioselective analysis of ZO and its impurities N-Ox and ACP in tablets using capillary electrophoresis with UV detection (CE-UV). The analytes were extracted from the tablets using acetonitrile and were separated in an uncoated fused-silica capillary (50 µm, 42 cm effective length, 50 cm total length) using 80 mmol L^{-1} sodium phosphate buffer, pH 2.5, and 5 mmol L^{-1} carboxymethyl-β-cyclodextrin as running buffer. The analytes and the internal standard (trimethoprim) were detected at 305 and 200 nm, respectively. A tension of 27 kV was applied and the capillary temperature was maintained at 25 ºC. All analytes were analyzed within 8 min and linear calibration curves over the

concentration range of 0.4–0.8 mg mL^{-1} for each ZO enantiomer, 0.8–1.6 µg mL^{-1} for ACP and 0.4–0.8 µg mL^{-1} for each N-Ox enantiomer were obtained. The coefficients of correlation obtained for the linear curves were greater than 0.99. The intra-day and inter-day accuracy and precision were lower than 2% for all analytes. This validated method was employed to study the degradation and racemization of ZO under stress conditions. The results obtained showed that ACP and N-Ox were both formed under the stress conditions used, but racemization was not observed.

Keywords: Zopiclone, metabolites and impurities, enantioselective analysis, biological materials, pharmaceutical formulations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema dos componentes básicos da cromatografía líquida aclopada a espectrometria de massas (Adaptado de Gates et al., 2006)..... 10

Figura 1.2 Esquema mostrando uma fonte de ionização por eletronebulização (Adaptado de Gates et al., 2006)..... 11

Figura 1.3 Esquema mostrando uma fonte de ionização por APCI (Adaptado de Gates et al., 2006)..... 12

Figura 1.4 Esquema dos componentes básicos de um sistema de eletroforese capilar..... 15

Figura 1.5 Representação do EOF em um capilar de sílica fundida..... 17

Figura 1.6 Perfil do fluxo eletrosmótico na CE e hidrodinâmico no HPLC (Adaptado de WEINBERGER, 2000)..... 19

Figura 1.7 Estruturas químicas da α-CD, β-CD e γ-CD..... 21

Figura 3.1 Estrutura da zopiclona (A), e dos seus metabólitos N-desmetilzopiclona (B) e zopiclona N-óxido (C). 29

Figura 3.2 Estrutura química da moclobemida utilizada como padrão interno..... 33

Figura 3.3 Cromatograma da solução-padrão (100 µg mL^{-1}) de ZO recém preparada em metanol (A) e estocada a -20ºC por um mês (B). Coluna CHIRALPAK AD, fase móvel constituída por hexano:isopropanol (6:4, v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305 nm..... 44

Figura 3.4 Cromatogramas referentes à análise da ZO na concentração de 100 ug mL^{-1} nas colunas CHIRALPAK AD- H (A e B) e CHIRALCEL OD- H (C). Vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305 nm. Fases móveis: (A) hexano:etanol (6:4, v/v), (B) hexano:isopropanol (6:4,v/v) e (C) hexano:etanol (4:6, v/v)..... 45

Figura 3.5 Cromatogramas referentes à análise da ZO na concentração de 100 ug mL^{-1} na coluna CHIROBIOTIC V. Vazão de 1,0 mL min^{-1}, detecção em 305 nm. Fases móveis: (A) metanol:água (7:3, v/v) 0,05 DEA, (B) metanol 100% 0,05 DEA e (C) acetonitrila 100% 0,05 DEA..... 46

Figura 3.6 Cromatogramas referentes à análise do N-Ox na concentração de 100 ug mL^{-1} na coluna CHIRALPAK ADR- H. Fase móvel : etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) sem DEA (A) e com 0,025% de DEA (B). Detecção em 305 nm, vazão de 1,0 mL min^{-1}..... 48

Figura 3.7 Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO e seus metabólitos em amostras de plasma de ratos. (A) branco de plasma de rato, (B) ZO, (C) N-Des, (D) N-Ox na concentração de 50 ng mL^{-1} de cada enantiômero. (E) MO na concentração 1 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) + 0,025% DEA, vazão de 1,0 mL min^{-1}. Infusão pós-coluna de ácido acético 1% (v/v) na vazão de 0,25 mL min^{-1}..... 51

Figura 3.8 Fluxograma do procedimento de extração otimizado..... 53

Figura 3.9. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações no tempo de análise da ZO (a), na resolução dos enantiômeros da ZO (b), na resolução dos enantiômeros da N-Ox (c), na resolução dos enantiômeros do N-Des (d), na área do (-)-(R)- ZO (e) e na área do (+)-(S)-ZO (f). A linha vertical representa o valor de t-crítico..... 63

Figura 3.10 Gráfico da concentração plasmática de (A) ZO, (B) N-Ox e (C) N-Des versus tempo de coleta, referente à análise das amostras de plasma de ratos após dose oral única de ZO. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n=6)..... 65

Figura 4.1 Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO na concentração de 100 ug mL^{-1}. Coluna CHIRACEL OD-R, fase móvel (A) etanol:água (50:50, v/v) e (B) etanol:metanol:ACN (20:60:20, v/v/v). Vazão: 1,0 mL e detecção em 305 nm..... 74

Figura 4.2 Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO na concentração de 100 ug mL-1. Fase móvel constituída por etanol:metanol:ACN (20:60:20, v/v/v) nas colunas (A) CHIRALPAK AD e (B) CHIRALPAK AD-RH. Coluna CHIRALPAK AD empregada com as fases móveis (C) etanol:metanol:ACN (20:40:40, v/v/v) e (D) etanol:metanol:ACN (20:30:50, v/v/v). Vazão: 1,0 mL e detecção em 305 nm. 75

Figura 4.3 Cromatograma de ZO na coluna CHIRALPAK AD, empregando a fase móvel constituída por ACN: etanol:metanol (60:20:20, v/v/v) na vazão de 1,3 mL min^{-1}..... 76

Figura 4.4 Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO em amostras de cérebro de ratos. (A) branco de cérebro de ratos, (B) ZO na concentração de 57,5ng g^{-1} de cada enantiômero (C) MO na concentração 1 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD, fase móvel: ACN: etanol:metanol (60:20:20, v/v/v), vazão: 1,3 mL min^{-1}..... 79

Figura 4.5 Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações no tempo de análise da ZO (a) e na resolução dos enantiômeros da ZO (b). A linha vertical representa o valor de t-crítico..... 85

Figura 4.6. Gráfico da concentração dos enantiômeros da ZO em cérebro de ratos versus tempo de coleta. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n=6)..... 86

Figura 5.1 Estruturas químicas da ZO (A) e impurezas N-Ox (B), RP 29307 (C), RP 48497 (D) e 2-amino-5-cloropiridina (E). 91

Figura 5.2 Estrutura da trimetoprina utilizada como padrão interno..... 95

Figura 5.3 Cromatograma das soluções -padrão de (A) ZO, (B) N-Ox e (C) ZO + N-Ox na coluna CHIRALPAK AD. Fase móvel constituída por hexano:isopropanol (6:4, v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305nm..... 105

Figura 5.4 Cromatogramas das soluções-padrão de (A) N-Ox e (B) ZO na concentração de 100 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALCEL OD-H, fase móvel constituída por hexano:etanol (4:6, v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305nm..... 105

Figura 5.5 Cromatograma das soluções-padrão de ACP, N-Ox e ZO na concentração de 100 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por etanol:metanol (5:5, v/v) contendo 0,3 % de DEA , vazão de 1,0 mL min^{-1}, detecção em 305nm..... 106

Figura 5.6 Cromatograma referente à análise de solução-padrão de ZO e de suas impurezas na concentração de 100 ug mL^{-1}. (1) Impureza ACP, (2 e 3) N-Ox, (4) enantiômero puro da impureza RP29307 da eszopiclona e (5 e 6) ZO. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por metanol:etanol:ACN (60:35:5, v/v/v) contendo 0,3% de DEA, vazão de 0,6 mL min^{-1}, detecção em 305 nm..... 107

Figura 5.7 Cromatograma referente à análise de ZO e suas impurezas em diferentes concentrações. ACP (1): 300 ng mL^{-1}, N-Ox (2 e 3): 300 ng mL^{-1}, RP29307 (4): 600 ng mL^{-1} e (5 e 6) ZO: 300 ug mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por metanol:etanol:ACN (60:35:5, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão de 0,6 mL min^{-1}, detecção em 305 nm. (B) expansão do cromatograma (A)..... 108

Figura 5.8 Influência do pH da solução tampão na separação dos enantiômeros da ZO e da N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L-1 contendo 20 mmol L-1 de β-CD, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC..... 110

Figura 5.9 Influência da concentração da solução tampão na separação dos enantiômeros da ZO e da N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio pH 2,5 contendo 20 mmol L-1 de β-CD, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC..... 111

Figura 5.10 Eletroferogramas mostrando a separação da ZO, N-Ox e ACP. Solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L-1, pH 2,5, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC. (A) β-CD 20 mmol L-1, (B) CM-β-CD 20 mmol L-1..... 112

Figura 5.11 Influência da concentração de CM-β-CD na separação dos enantiômeros da ZO e do N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio 50mmol L^{-1} pH 2,5, tensão 25Kv, temperatura 25ºC..... 113

Figura 5.12 Influência da temperatura na separação dos enantiômeros da ZO e do N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio 80 mmol L^{-1}, pH 2,5, contendo 5 mmol L^{-1} de CM-β-CD, tensão 27Kv 115

Figura 5.13. Eletroferogramas referentes à análise da ZO e suas impurezas. ACP (1), TRI - IS (2), (-)-(R)-ZO (3), (+)-(S)-ZO (4), (-) - (R)-N-Ox (5), e (+)-(S)-N-Ox (6) nas concentrações de 50 µg mL-1 de cada enantiômero da ZO e N-Ox, 100 µg mL-1 para ACP e 20 µg mL-1 para o TRI. (A) 305 nm, (B) 200 nm..... 117

Figura 5.14 Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações na (a) área da (-)-(R)-ZO, (b) área da (+)-(S)-ZO, (c) tempo de migração da ZO e (d) resolução dos enantiômeros da ZO. A linha vertical representa o valor de t-crítico..... 122

Figura 5.15 Eletrofrograma da análise da ZO em comprimidos..... 123

Figura 5.16 Eletroferogramas referentes a análise das amostras de ZO submetidas à hidrólise alcalina (A), hidrólise ácida (B), reação de oxidação (C) e fotodegradação (D). Tempo de exposição: 120 minutos para cada condição de estudo..... 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos..... 7
Tabela 3.1 – Infusão pós-coluna..... 50
Tabela 3.2 – Influência do pH na extração dos enantiômeros da ZO e seus metabólitos..... 52
Tabela 3.3 – Efeito da matriz na análise de ZO, N-Ox, N-Des e MO em plasma de ratos..... 55
Tabela 3.4 – Linearidade do método..... 56
Tabela 3.5 – Recuperação do método..... 58
Tabela 3.6 – Precisão e exatidão do método..... 59
Tabela 3.7 – Limite de Quantificação do método..... 60
Tabela 3.8 – Estabilidade do método..... 61
Tabela 4.1 – Efeito da matriz na análise de ZO e MO em cérebro de ratos..... 80
Tabela 4.2 – Linearidade do método de análise de ZO em cérebro de ratos..... 81
Tabela 4.3 – Recuperação do método de análise de ZO em cérebro de ratos.... 81
Tabela 4.4 – Precisão e exatidão do método de análise de ZO em cérebro de ratos..... 83
Tabela 4.5 – Limite de Quantificação do método de análise de ZO em cérebro de ratos..... 84
Tabela 4.6 – Estabilidade do método de análise de ZO em cérebro de ratos..... 84
Tabela 4.7 - Concentração dos enantiômeros da ZO em cérebro de ratos versus tempo de coleta 86
Tabela 5.1 – Parâmetros avaliados no estudo fatorial completo da robustez do método..... 102
Tabela 5.2 Influência da tensão... 114
Tabela 5.3 Pureza de pico da ZO em cada teste de degradação..... 119
Tabela 5.4 Linearidade do método 120
Tabela 5.5 Precisão, exatidão, LOD e LOQ do método..... 121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ACP	Impureza 2-amino-5-cloropiridina ou RP26695
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
APPI	Fotoionização a pressão atmosférica
β-CD	β-ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
CE	Eletroforese capilar
CM- β-CD	β-ciclodextrina carboximetilada
CSP	Fase estacionária quiral
CV%	Coeficiente de variação percentual
DEA	Dietilamina
DM-β-CD	Heptakis (2,6-di-*O*-metil)-β-ciclodextrina
E%	Erro relativo
EOF	Fluxo eletrosmótico
ESI	Ionização por eletronebulização
FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
HP-β-CD	2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
LC-MS-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
LLE	Extração líquido-líquido
LOQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
MIP	Polímero impresso molecularmente
MO	Moclobemida
MS	Espectrometria de massas
N-Des	N-desmetilzopiclona
N-Ox	Zopiclona-N-óxido ou Impureza A ou RP29753

IS	Padrão interno
Q	Quadrupolo
QC	Amostras-controle
Rs	Resolução
RP29307	Impureza B da ZO
RP 48497	Impureza C da ZO
SPE	Extração em fase sólida
SEM	Monitoramento de reações selecionadas
S- β-CD	β-ciclodextrina sulfatada
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
TM-β-CD	Heptakis (2,3,6-tri-*O*-metil)-β-ciclodextrina
TOF	Analisador por tempo de vôo
TRI	Trimetropina
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
ZO	Zopiclona
μef	Mobilidade eletroforética
μeo	Mobilidade eletrosmótica
V	Velocidade do íon
E	Campo elétrico
q	Número de cargas
η	Viscosidade
r	Raio do íon
ζ	Potencial zeta
V_{eo}	Velocidade eletrosmótica
ε	Constante dielétrica

SUMÁRIO

Resumo..... i
Abstract..... iii
Lista de figuras..... v
Lista de tabelas..... x
Lista de abreviaturas e siglas xi

1. INTRODUÇÃO GERAL..... 1
1.1FÁRMACOS QUIRAIS E A ZOPICLONA..... 2
1.2 TÉCNICAS DE ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA..... 5
1.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... 5
1.2.1.1 Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos..... 6
1.2.1.2 Fases estacionárias quirais baseadas em proteínas..... 8
1.2.1.3 Fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos..... 9
1.2.2Eletroforese capilar 14
1.2.2.1 Separação de enantiômeros por CE..... 20
1.2.2.2 Seletores quirais..... 20
1.3 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA A PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.... 22
1.3.1 Extração Líquido-Líquido..... 23
1.3.2 Extração em fase sólida..... 24
2. OBJETIVO GERAL..... 26
3. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA ZO E SEUS METABÓLITOS EM PLASMA DE RATOS 28
3.1 INTRODUÇÃO..... 29
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO..... 31
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 32
3.3.1 Materiais..... 32
3.3.1.1 Reagentes e solventes..... 32
3.3.1.2 Soluções-padrão..... 32
3.3.1.3 Animais..... 34
3.3.1.4 Equipamentos e acessórios..... 34
3.3.1.5 Colunas cromatográficas quirais e coluna guarda..... 35
3.3.2 Métodos..... 37
3.3.2.1 Avaliação das colunas quirais..... 37
3.3.2.2 Otimização da detecção..... 38
3.3.2.3 Ordem de eluição..... 39
3.3.2.4 Procedimento de preparação da amostra..... 39
3.3.2.5 Validação do método..... 40
3.3.2.6 Aplicação do método..... 42
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 43
3.4.1 Separação quiral..... 43
3.4.2 Procedimento de preparação das amostras..... 52
3.4.3 Validação bioanalítica do método desenvolvido..... 54
3.4.3.1 Seletividade..... 54
3.4.3.2 Efeito da matriz na ionização dos analitos..... 55
3.4.3.3 Linearidade..... 56

3.4.3.4 Recuperação..... 57
3.4.3.5 Precisão e exatidão..... 58
3.4.3.6 Limite de quantificação..... 60
3.4.3.7 Estabilidade..... 60
3.4.3.8 Robustez..... 62
3.4.4 Aplicação do método..... 64
4. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA ZO EM CÉREBRO DE RATO 66
4.1 INTRODUÇÃO..... 67
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO..... 68
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 68
4.3.1 Materiais..... 68
4.3.1.1 Reagentes e solventes..... 68
4.3.1.2 Soluções-padrão..... 68
4.3.1.3 Animais..... 69
4.3.1.4 Equipamentos e acessórios..... 69
4.3.1.5 Colunas cromatográficas quirais e coluna de guarda..... 70
4.3.2 Métodos..... 71
4.3.2.1 Separação cromatográfica..... 71
4.3.2.2 Ordem de eluição..... 71
4.3.2.3 Procedimento de preparação das amostras..... 71
4.3.2.4 Validação do método..... 72
4.3.2.5 Aplicação do método..... 73
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 73
4.4.1 Separação quiral..... 73
4.4.2 Procedimento de extração..... 76
4.4.3 Validação do método bioanalítico desenvolvido..... 78
4.4.3.1 Seletividade 79
4.4.3.2 Efeito da matriz na ionização dos analitos..... 80
4.4.3.3 Linearidade..... 80
4.4.3.4 Recuperação..... 81
4.4.3.5 Precisão e exatidão 82
4.4.3.6 Limite de Quantificação..... 83
4.4.3.7 Estabilidade..... 84
4.4.3.8 Robustez..... 85
4.4.4 Aplicação do método..... 86
5. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA ZO E SUAS IMPUREZAS..... 88
5.1 INTRODUÇÃO..... 89
5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO..... 93
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS 94
5.3.1 Materiais..... 94
5.3.1.1 Reagentes e solventes..... 94
5.3.1.2 Soluções-padrão..... 94
5.3.1.3 Equipamentos e acessórios..... 95
5.3.2 Método..... 97
5.3.2.1 Avaliação das colunas quirais..... 97
5.3.2.2 Otimização da separação dos enantiômeros da ZO e de suas impurezas por CE 98
5.3.2.3 Ordem de migração eletroforética..... 99
5.3.2.4. Procedimento de preparação da amostra..... 99
5.3.2.5 Validação do método..... 100

5.3.2.6. Aplicação do método..... 102
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 104
5.4.1 Análise por LC-UV..... 104
5.4.1.1 Separação quiral..... 104
5.4.2 Análise por CE-UV..... 109
5.4.2.1 Separação quiral..... 109
5.4.2.1.1 Efeito do pH e concentração da solução tampão..... 109
5.4.2.1.2 Avaliação dos seletores quirais..... 112
5.4.2.1.3 Temperatura e tensão..... 113
5.4.2.1.4 Condições definidas para análise por CE-UV..... 115
5.4.2.2 Validação analítica do método desenvolvido..... 118
5.4.2.2.1 Seletividade..... 119
5.4.2.2.2 Linearidade..... 120
5.4.2.2.3 Precisão e exatidão..... 120
5.4.2.2.4 Limite de detecção e de quantificação..... 121
5.4.2.2.5 Robustez..... 122
5.4.2.3 Aplicação do método validado..... 123
6. CONCLUSÕES 126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 129
ANEXO 1. Protocolo 09.1.1175.53.0 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 143

Introdução Geral

1. INTRODUÇÃO

1.1. FÁRMACOS QUIRAIS E A ZOPICLONA

A quiralidade é uma propriedade inerente do nosso organismo (AGRANAT; CANER; CALDWELL, 2002). O alto grau de estereosseletividade de muitos processos biológicos implica que quando uma mistura racêmica é administrada como um medicamento, os estereoisômeros podem não ser equipotentes (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). Desta forma, diferenças estereosseletivas significativas quanto à potência, toxicidade, absorção, distribuição, metabolismo e eliminação podem ser observados.

O caso da talidomida é um exemplo clássico da importância da quiralidade na farmacodinâmica e na disposição cinética de fármacos quirais. A talidomida marca uma das mais terríveis tragédias da história da farmacoterapia com o nascimento de milhares de crianças que apresentavam graves deformidades congênitas. Somente depois do estudo das suas propriedades estereosseletivas é que se percebeu que o fármaco, até então vendido como racemato, continha seu enantiômero dextrógiro com ação sedativa e hipnótica e o enantiômero levógiro com ação teratogênica. Esse caso trouxe mudanças na legislação e no desenvolvimento de novos fármacos (SILVA JUNIOR et al, 2006; SMITH, 2009).

Devido às diferentes propriedades biológicas que cada enantiômero pode exercer nos processos bioquímicos, o conhecimento da influência da estereoseletivade tornou-se um grande desafio para os pesquisadores e para a indústria farmacêutica. A quiralidade passou a ser considerada no planejamento e na síntese de novos produtos farmacêuticos. Além disso, a indústria farmacêutica passou a avaliar as propriedades cinéticas e dinâmicas de fármacos já comercializados como racematos, com o objetivo de produzir novos medicamentos baseados nesses fármacos na forma de enantiômeros puros (*chiral switch*). Lipitor (atorvastatina cálcica), Plavix (bisulfato de clopidogrel) e Nexium (esomeprazol magnésio) são exemplos de fármacos comercializados como enantiômeros puros.

Esses três medicamentos estão entre os mais vendidos em 2008 e juntos permitiram o arrecadamento de 30 bilhões de dólares. (AGRANAT; WAINSCHTEIN, 2010; SILVA JUNIOR et al., 2006, JANNUZZI; VASCONCELLOS; DE SOUZA, 2008; SMITH, 2009).

A história do uso de fármacos quirais deixa claro que nenhum fármaco está tão extensivamente estudado que tudo possa ser previsto sobre as diferenças farmodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas que seus enantiômeros irão apresentar (ORLANDO et al., 2007). Assim, para entender o papel da esteroquímica nas propriedades farmacocinéticas de fármacos quirais, é necessário o desenvolvimento de métodos de análise, possibilitando a separação, identificação e quantificação dos isômeros isolados não só na matéria prima e medicamentos, mas também em matrizes biológicas (HUTT; VALENTOVÁ, 2003; BONATO; JABOR, GAITANI, 2005).

Neste estudo, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas foi empregada no desenvolvimento de métodos para análise enantiosseletiva da zoplicona (ZO) e seus metabólitos em matrizes biológicas, enquanto que a eletroforese capilar foi selecionada para análise quiral da ZO e suas impurezas em matéria prima e formulação farmacêutica.

A ZO, éster piridinilpirrolpirazinílico do ácido 4-metilpiperazinocarboxílico, foi o primeiro hipnótico pertencente à família das ciclopirrolonas disponibilizado comercialmente. Sua estrutura não está correlacionada com os benzodiazepínicos, mas, apesar disso, ela atua no mesmo receptor, ou seja, o receptor GABA (PIPERAKI; PARISI-POULOU, 1996; NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA, 2006).

A ZO pertence à classe dos fármacos-Z indicados para o tratamento da insônia, doença caracterizada pelo distúrbio do sono normal, quer seja pela dificuldade em iniciar o sono ou dificuldade em mante-lo. A literatura epidemiológica recente mostra que 30-48% das pessoas reportam terem sintomas de insônia e cerca de 8–18% relatam estarem descontentes com a qualidade ou quantidade de sono. Entretanto, apenas 6% desses indivíduos apresentam os parâmetros que diagnosticam o quadro de insônia (NHS, 2004). A insônia é uma doença preocupante, pois causa grande impacto na saúde, no trabalho e na qualidade de

vida da população, causando fadiga, estresse e danos à rotina do paciente (CURRY; EISENSTEIN; WALSH, 2006; NIH, 2005; NUTT; STAHL, 2011; SCHUTTE-RODIN et al., 2008).

Entre os hipnóticos utilizados para a indução do sono, os benzodiazepínicos são amplamente empregados. A principal preocupação quanto ao uso dos benzodiazepínicos se dá devido à dependência química que eles podem resultar. A literatura mostra que 10–30% dos usuários crônicos de benzodiazepínicos são dependentes, ou então, que 50% de todos os usuários sofrem com os sintomas de retirada do medicamento (NHS, 2004, CURRY; EISENSTEIN; WALSH, 2006; SCHUTTE-RODIN et al., 2008). Em contrapartida, os fármacos-Z não possuem essa desvantagem e também não causam sedação do dia seguinte (NHS, 2004; SCHUTTE-RODIN et al., 2008; NUTT; STAHL, 2011).

A ZO possui um centro quiral sendo produzida na forma de mistura racêmica de dois estereoisômeros, apesar da atividade farmacológica estar relacionada apenas com o enantiômero (+)-(S), também denominado eszopiclona (MISTRI et al., 2008). A eszopiclona, enantiômero puro da ZO, é comercializada pela SEPRACOR como “Lunesta”, já tendo sido aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) (WESSELL; WEART, 2005).

No Brasil, a ZO é comercializada apenas como mistura racêmica, mas a formulação contendo o enantiômero puro poderá ser disponibilizada em breve, a exemplo do que aconteceu com outros fármacos (AGRANAT; CANER; CALDWELL, 2002). Sendo assim, métodos estereosseletivos para a determinação do fármaco e impurezas são essenciais para garantir a qualidade do medicamento disponibilizado para a população.

A dose recomendada clinicamente de ZO é de 7,5 mg. Depois de administrado por via oral, o fármaco é rapidamente absorvido, apresentando pico de concentração plasmática de 60 ng mL^{-1} em 90 minutos, com biodisponibilidade de cerca de 80%. O fármaco é rapidamente distribuído, a partir do compartimento vascular, nos tecidos orgânicos, incluindo o cérebro; é excretado na urina, saliva e leite materno. A ligação às proteínas plasmáticas é baixa (45%) e não saturável, havendo assim, pouco risco de interação medicamentosa (PIPERAKI; PARISI-

POULOU, 1996; NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA, 2006; MISTRI et al., 2008). A ZO é metabolizada no fígado a dois principais metabólitos, a N-desmetil zopiclona (N-Des, sem atividade hipnótica, mas com atividade ansiolítica) e a zopiclona-N-óxido (N-Ox, metabólito menos ativo que o fármaco) (BECQUEMONT et al., 1999).

A disposição cinética da ZO também é estereosseletiva, com maiores concentrações plasmáticas, urinárias e no cérebro do enantiômero (+)-(S)-ZO (FOSTER et al.,1994; PIPERAKI; PARISI-POULOU, 1996, FERNANDEZ et al., 1991; 1993 e 2002). Maiores concentrações dos enantiômeros (+)-(S)-N-Des e (+)-(S)-N-Ox também foram relatadas na literatura (PIPERAKI; PARISI-POULOU, 1996; FERNANDEZ et al., 1991; 1993 e 2002).

1.2.TÉCNICAS DE ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA

1.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography,* HPLC) é a técnica mais utilizada para a separação de enantiômeros (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). Essa separação pode ser feita através de procedimentos diretos ou indiretos. Os procedimentos indiretos baseiam-se na derivação quiral, na qual o composto quiral reage com um reagente de derivação enantiomericamente puro, originando diastereoisômeros que depois são separados usando uma coluna com fase estacionária convencional. As principais desvantagens do procedimento indireto são a necessidade de reagentes quirais com alto grau de pureza e o tempo gasto na etapa de formação dos diastereoisômeros (HAGINAKA, 2002; MISLANOVÁ; HUTTA, 2003). O procedimento direto é realizado empregando colunas com fases estacionárias quirais ou fases móveis contendo aditivos quirais, possibilitando a formação de diastereoisômeros temporários na fase estacionária ou na fase móvel, o que resulta na separação dos enantiômeros. O uso de fase móvel contendo aditivos quirais não é muito atrativo devido ao maior custo e à maior dificuldade na otimização do método e na remoção do aditivo empregado na

fase móvel, quando se faz separações em escala preparativa. O uso de fases estacionárias quirais (*Chiral Stationary Phases*, CSP) tem sido preferido devido à separação ser mais simples e reprodutível. Somado a isso, o grande número de colunas quirais disponíveis comercialmente, a possibilidade do emprego em escala preparativa ou analítica e a praticidade e facilidade no desenvolvimento dos métodos de análise, tornam o uso das CSPs bastante vantajoso. As CSPs são em sua maioria constituídas de um suporte de sílica ou sílica – aminopropil, ao quais os seletores quirais são incorporados ou quimicamente ligados. Essas CSPs são baseadas, principalmente, em polissacarídeos, antibióticos e proteínas (DE SANTANA et al., 2009).

1.2.1.1 Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos

As CSP baseadas em derivados de polissacarídeos, principalmente celulose e amilose, são amplamente empregadas na cromatografia líquida quiral (YASHIMA, 2001). A forma *in natura* desses polissacarídeos possui propriedades quirais limitadas, mas a derivação destes polímeros aumenta sua habilidade de reconhecimento quiral. A incorporação ou ligação química desses derivados a partículas de sílica aumenta a estabilidade mecânica da fase estacionária resultante. O mecanismo de resolução quiral depende do encaixe das moléculas dos enantiômeros na estrutura em forma de calha do derivado de polissacarídeo e na interação dos enantiômeros com os substituintes introduzidos durante a derivação. Os principais tipos de interações que podem ocorrer entre o analito e a CSP são ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações π -π. A **Tabela 1.1** mostra algumas das diferentes CSPs baseadas em polissacarídeos. Essas CSPs podem ser utilizadas nos modos de eluição normal, reverso e polar orgânico (OKAMOTO; YASHIMA, 1998).

As CSPs são geralmente preparadas com o derivado do polissacarídeo revestindo um suporte de sílica. Fases estacionárias obtidas pela ligação química dos derivados de polissacarídeos em sílica também são disponíveis comercialmente,

sendo que as primeiras foram desenvolvidas pelo grupo de Okamoto (OKAMOTO et al., 1987). Exemplos de CSPs quimicamente ligadas comercializadas pela Daicel são: Chiralpak IA, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, Chiralpak IB, tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e Chiralpak IC, tris(3,5-diclorofenilcarbamato) de celulose (LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010).

Tabela 1.1 Fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos.

Seletor quiral	Nome comercial	Tamanho das partículas (µm)	Modo de eluição
Tris (3,5-dimetilfenil) carbamato de amilose	CHIRALPAK AD	10	Fase normal
	CHIRALPAK AD-R	10	Fase reversa
	CHIRALPAK AD-H	5	Fase normal
	CHIRALPAK AD-RH	5	Fase reversa
Tris [(S)-α-metilbenzilcarbamato] de amilose	CHIRALPAK AS	10	Fase normal
	CHIRALPAK AS-H	5	Fase normal
	CHIRALPAK AS-RH	5	Fase reversa
Tris (3,5-dimetilfenil) carbamato de celulose	CHIRALCEL OD	10	Fase normal
	CHIRALCEL OD-R	10	Fase reversa
	CHIRALCEL OD-H	5	Fase normal
	CHIRALCEL OD-RH	5	Fase reversa
Tris (4-metilbenzoato) de celulose	CHIRALCEL OJ	10	Fase normal
	CHIRALCEL OJ-H	5	Fase normal
	CHIRALCEL OJ-RH	5	Fase reversa
Tris (4-metilfenilcarbamato) de celulose	CHIRALCEL OG	10	Fase normal
Tris(4-cloro-3-metilfenilcarbamato) de celulose	LUX CELLULOSE-4	3 e 5	Fase normal, polar orgânico e reversa
Tris(4-metilbenzoato) de celulose	LUX CELLULOSE-3		
Tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulose	LUX CELLULOSE-2		
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose	LUX CELLULOSE-1		
Tris(5-cloro-2-metilfenilcarbamato) de amilose	LUX AMYLOSE-2		

Fases móveis constituídas por misturas de solventes apolares como hexano e solventes orgânicos polares como etanol e isopropanol são empregadas no modo normal. Além disso, aditivos como dietilamina (DEA) e ácido trifluoracético (TFA) podem ser utilizados para melhorar a simetria dos picos através do bloqueio dos grupos silanóis residuais presentes no suporte de sílica empregado na preparação da fase estacionária. No modo reverso, são empregadas misturas de soluções aquosas e solventes orgânicos. Na análise de solutos ácidos, a solução aquosa é acidificada para mantê-los na forma não dissociada. No caso de solutos básicos, o pH é ajustado com uma solução tampão ou então se emprega perclorato de sódio para formar pares iônicos com os analitos básicos (TACHIBANA; OHNISH, 2001; OKAMOTO; YASHIMA, 1998). No modo polar orgânico, os eluentes utilizados constituem-se de solventes polares puros ou misturas de solventes como, por exemplo, metanol, etanol, acetonitrila, etc.. Esse modo é importante principalmente para fármacos pouco solúveis no modo normal (LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010).

Embora os fabricantes das colunas recomendem o emprego de colunas específicas para cada modo de eluição, por exemplo, CHIRALCEL OD para o modo normal e CHIRALCEL OD-R para o modo reverso (Tabela 1.1), essas colunas podem ser utilizadas em todos os modos, desde que se faça um condicionamento adequado empregando um solvente intermediário, como por exemplo, etanol (LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010).

1.2.1.2 Fases estacionárias quirais baseadas em proteínas

As CSPs baseadas em proteínas permitem a análise de uma série de compostos quirais. Essas colunas não apresentam a mesma robustez das CSPs baseadas em polissacarídeos e são utilizadas somente em escala analítica, já que, por possuírem baixa capacidade, não são adequadas para separações em escala preparativa. Para preparação dessas fases estacionárias tem sido empregado, por exemplo, albumina (soroalbumina bovina ou humana), glicoproteínas oriundas da

clara do ovo (ovomucóide, avidin, ovoglicoproteína), enzimas (pepsina, lisozima, amiloglicosidase), entre outras (HAGINAKA, 2002).

O pH da fase móvel, a quantidade e o tipo de solventes orgânicos, a presença de aditivos e a temperatura podem modificar a conformação espacial e os sítios de discriminação quiral destes seletores. A alteração do pH da fase móvel altera a distribuição de cargas na proteína e, assim, modifica os sítios de discriminação quiral da proteína, podendo haver, inclusive, inversão na ordem de retenção. Já a porcentagem de solvente orgânico e o tipo de solvente que compõem a fase móvel afetam as interações hidrofóbicas com os sítios apolares presentes na proteína e assim modificam a retenção dos enantiômeros e também podem alterar a conformação da proteína. A alteração nestes parâmetros pode afetar a retenção e a enantiosseletividade de cada substância estudada (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005; LOURENÇO; CASSIANO; CASS, 2010).

1.2.1.3 Fases estacionárias quirais baseadas em antibióticos

Os antibióticos macrocíclicos, por interagirem estereosseletivamente com os analitos de diferentes formas, constituem uma classe de seletor quiral importante para a resolução de muitos fármacos que não são separados por CSPs baseadas em polissacarídeos ou proteínas. Alguns exemplos de antibióticos empregados na preparação de CSP são: vancomicina, teicoplanina e ristocetina A. Essas CSPs são produzidas através da imobilização do antibiótico à superfície da sílica por ligação covalente e podem ser usadas nos modos de eluição normal, reverso e polar orgânico. As colunas preparadas com essas CSP apresentam várias vantagens como boa estabilidade mecânica, boa relação custo/benefício, alta capacidade, podendo ser empregadas em escala preparativa, além da possibilidade de se utilizar os três modos de eluição sem dano para a coluna (WARD; FARRIS, 2001). Alguns exemplos de colunas baseadas em antibióticos disponíveis comercialmente são: CHIROBIOTIC V (vancomicina), CHIROBIOTIC T (teicoplanina), CHIROBIOTIC R (ristocetina) e CHIROBIOTIC TAG (teicoplanina aglicona) (SIGMA-ALDRICH, 2010).

A análise enantiosseletiva por HPLC é feita empregando detectores convencionais (detectores por absorção no UV-VIS e fluorescência, por exemplo) e também é beneficiada pelos recentes avanços no acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (**Figura 1.1**). O sucesso desse acoplamento só foi alcançado com o desenvolvimento de interfaces para ionização à pressão atmosférica (GATES et al., 2006). Durante o desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS), surgiu várias fontes de ionização sendo que as mais importantes para análise de fármacos são a ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*, ESI), ionização química à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) e fotoionização à pressão atmosférica (*Atmospheric Pressure PhotoIonization*, APPI)

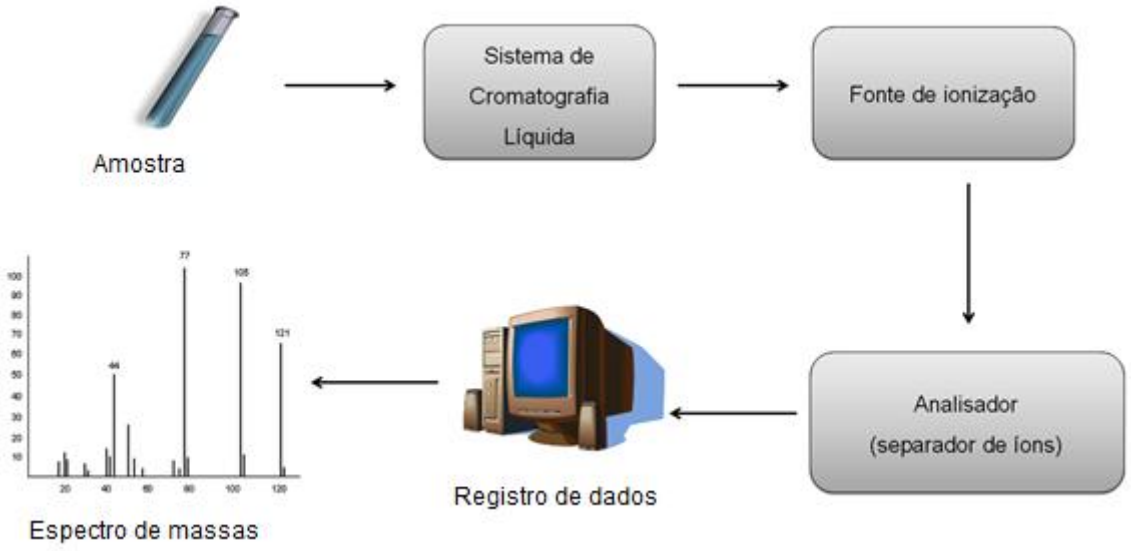


Figura 1.1. Esquema dos componentes básicos da cromatografía líquida aclopada a espectrometria de massas (Adaptado de Gates et al., 2006).

Na ESI (**Figura 1.2**), o analito é introduzido no sistema através de um capilar de aço inoxidável, mantido em um potencial e temperatura adequados. Isso leva a uma nebulização do efluente da coluna e formação de cargas na superfície das gotículas com a mesma polaridade da carga aplicada no capilar. Essas gotas são repelidas pelo capilar e ao atravessar o espaço entre o capilar e o cone, ocorre a evaporação do solvente. Essa evaporação leva a um aumento da tensão superficial que, juntamente com a presença da carga, ocasiona a denominada "Explosão Columbica" (Gates, et al., 2006). O resultado desse processo é a ionização e fragmentação moderada do analito. A ESI é empregada para a análise da maioria dos compostos, principalmente ácidos e básicos. Também é usada para a análise de macromoléculas.

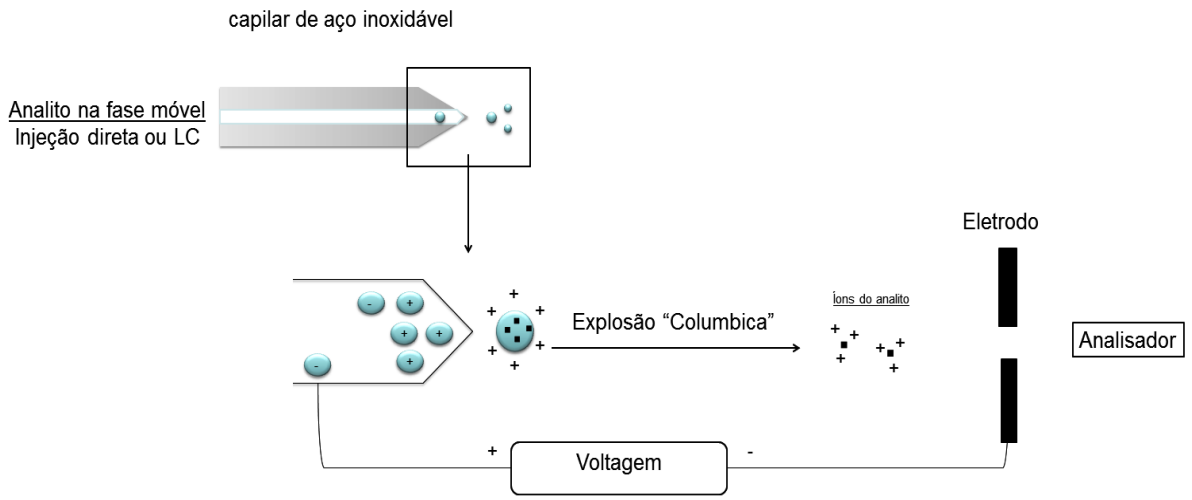


Figura 1.2. Esquema mostrando uma fonte de ionização por eletronebulização (Adaptado de Gates et al., 2006).

Na APCI (**Figura 1.3**), a solução do analito entra em um nebulizador pneumático, no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O *spray* formado passa por uma região aquecida para evaporação. A fase móvel é ionizada pela aplicação de uma descarga corona e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que promove a sua ionização e fragmentação. A APCI é usada na análise de compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa (GATES et al., 2006; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

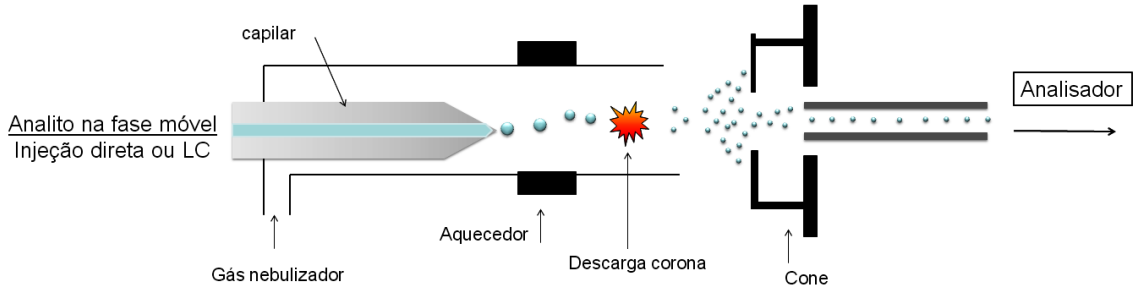


Figura 1.3. Esquema mostrando uma fonte de ionização por APCI (Adaptado de Gates et al., 2006).

Na APPI, um nebulizador aquecido transforma o efluente da coluna cromatográfica em um *spray* e gera sua dessolvatação parcial. A ionização das moléculas do analito presentes nas gotículas do *spray* é realizada através da radiação emitida por uma lâmpada UV com potência de 10,2 eV. O íon molecular é formado a partir da absorção de um fóton por uma molécula, seguida da ejeção de um elétron. A detectabilidade dessa técnica é comparável à obtida com a APCI, quando são empregadas altas vazões do eluente. Nos casos em que são utilizadas baixas vazões, a APPI mostra-se superior. Além disso, se comparada a APCI e a ESI, esta fonte de ionização é menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença sais no eluente (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O processo de ionização pode gerar três tipos de íons: os íons moleculares, as moléculas protonadas ou desprotonadas e moléculas cationizadas ou anionizadas. Os íons moleculares são oriundos de reações de oxidação ou redução ($M^{+\bullet}$) ou ($M^{-\bullet}$). Em casos de reações ácidas ou reações básicas como uma protonação ou desprotonação são observadas moléculas protonadas ($[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M-H]^-$) . O terceiro tipo de ions observados corresponde a uma coordenação com cátions ou ânions formando, por exemplo $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Cl]^-$, entre outros (CROTTI, et al., 2006).

As espécies carregadas que se formam na fonte de ionização são posteriormente separadas por um analisador de massas, escolhido dependendo das características da amostra e da aplicação desejada. Os principais analisadores de massas são: quadrupolo (Q), analisador por tempo de vôo (*Time-of-Flight,* TOF), *ion-trap* e *orbitrap* (CROTTI, et al., 2006).

O quadrupolo é um analisador de baixa resolução, formado por hastes em paralelo, conectadas eletricamente. A voltagem aplicada a essas hastes é responsável por determinar quais íons de determinada razão m/z atravessarão o quadrupolo em uma trajetória estável (GATES et al., 2006; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O TOF baseia-se no princípio de que as velocidades dos íons serão diferentes de acordo com suas massas. Desta forma, considerando que a velocidade é inversamente proporcional à raiz quadrada da massa do íon, os íons produzidos na fonte de ionização são acelerados através de um tubo para serem identificados através do tempo que levam para atravessá-lo em função da razão m/z de cada íon. Esse analisador tem como características principais a alta resolução e exatidão de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O *ion-trap* também é um analisador de baixa resolução e corresponde a um quadrupolo tridimensional que armazena e aprisiona todos os íons que são introduzidos em seu interior. A aplicação de determinada radiofrequência torna os íons de certa razão m/z instáveis e os liberta (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Um novo tipo de analisador que também aprisiona os ions é o chamado

orbtrap. Esse analisador tem como principais vantagens a alta resolução e extatidão de massas (MAKAROV, 2000).

A melhor opção para a quantificação de fármacos em matrizes biológicas é a utilização da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (*Liquid Chromatography-Tanden Mass Spectrometry*, LC-MS-MS), geralmente empregando equipamentos triploquadrupolo operando no modo denominado monitoramento de reações selecionadas (SRM). Nesse caso, o primeiro quadrupolo é utilizado para isolar o íon de interesse (geralmente $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$) dentre os vários ions gerados na fonte de ionização. O segundo quadrupolo é utilizado como cela de colisão. Neste segundo quadrupolo o íon de interesse que foi selecionado é fragmentado. O terceiro quadrupolo seleciona um dos fragmentos formados. Essa técnica fornece alta seletividade já que para ser detectado, o analito precisa ter a massa molecular do íon selecionado no primeiro quadrupolo e precisa ser fragmentado formando o íon específico selecionado no terceiro quadrupolo. Como o equipamento precisa monitorar apenas massas específicas, ele se torna bastantes sensível, possibilitando a obtenção de limites de quantificação da ordem de ng mL^{-1} (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O uso de LC-MS-MS tem se tornado a técnica de escolha para a quantificação de fármacos e metabólitos em matrizes biológicas. Entretanto, o uso dessa técnica em cromatografia quiral requer alguns cuidados com relação à escolha da fase móvel, devido a problemas de segurança e eficiência de ionização das moléculas (fases móveis baseadas em hexano) ou problemas de entupimentos quando do uso de sais não voláteis (PÈREZ; BACELÓ, 2008).

1.2.2 Eletroforese capilar

Outra técnica implementada nos últimos anos como ferramenta de separação é a eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE). A CE é fundamentada na migração diferencial de íons ao longo de um capilar na presença de um campo elétrico. O equipamento utilizado é composto por uma fonte de alta tensão que origina o campo elétrico, um capilar com diâmetro interno de 25 a 100 µm,

preenchido com uma solução de eletrólitos e mergulhado em dois recipientes que contem também os eletrodos conectados a fonte de alta tensão, um sistema de introdução da amostra e um detector conectado ao sistema de aquisição de dados (ALTRIA, 1996). A **Figura 1.4** mostra o esquema de um sistema de CE.

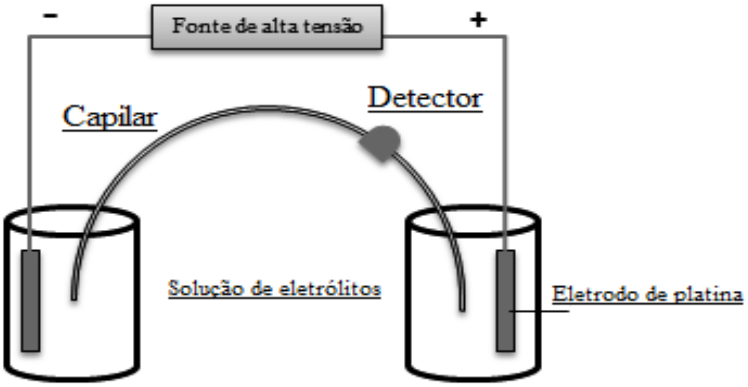


Figura 1.4 Esquema dos componentes básicos de um sistema de eletroforese capilar.

A análise por CE começa com o preenchimento do capilar com uma solução de eletrólitos apropriada. Isso normalmente é feito por pressurização do recipiente que contem essa solução. Em seguida, uma das pontas do capilar (extremidade oposta ao detector) é introduzida no recipiente que contem a amostra para sua injeção no capilar por pressurização (injeção hidrodinâmica) ou por aplicação de tensão (injeção eletrocinética). Depois disso, cada extremidade do capilar é introduzida em um reservatório diferente contendo um eletrodo e o tampão de análise. A tensão é aplicada ao capilar e esta causa movimentos eletroforéticos e eletrosmóticos, ocorrendo assim, a migração e a separação das espécies.

Os princípios da CE são os mesmos da eletroforese clássica, mas o uso de capilares favorece a dissipação do calor, uma vez que a área superficial interna é bem maior que o volume do capilar. Sendo assim, o calor gerado pela passagem da corrente elétrica através do meio (efeito Joule) é mais facilmente dissipado. Portanto, é possível aplicar tensões bem maiores (30 kV) que aquelas utilizadas na eletroforese clássica, sem que haja gradientes de temperatura no capilar, o que prejudica a separação dos analitos de interesse (ALTRIA, 1996).

A separação em CE depende da mobilidade eletroforética do analito (μ_{ef}) e do fluxo eletrosmótico da solução (μ_{eo}) (ALTRIA, 1996).

A mobilidade eletroforética (μ_{ef}) de cada íon depende de seu tamanho e do número de cargas:

$$\mu_{ef} = (q / 6 \pi \eta r)$$

Onde ***q*** é o número de cargas, η é a viscosidade do meio e ***r*** é o raio do íon.

Desta forma, um íon pequeno se moverá mais rapidamente do que um íon maior com o mesmo número de cargas. As moléculas neutras possuem mobilidade eletroforética igual a zero (ALTRIA, 1996).

A velocidade eletroforética de cada íon é dada pela equação:

$$V = \mu_{ef} \times E$$

Onde **v** é a velocidade do íon, $\boldsymbol{\mu_{ef}}$ é a mobilidade eletroforética e **E** é campo elétrico aplicado.

Assim, quanto maior for a tensão aplicada, maior será a velocidade de migração do íon no interior do capilar.

A migração dos analitos em CE é influenciada também pelo fluxo eletrosmótico (*electroosmotic flow*, EOF). O EOF ocorre em razão da ionização dos grupos silanóis ácidos presentes na parede do capilar de sílica fundida quando em contato com soluções tampão em pHs aproximadamente superiores a 5 (soluções neutras ou alcalinas). Nessas condições, os grupamentos silanóis ácidos encontram-se com carga negativa ($Si\text{-}O^-$); uma camada de cátions provenientes da solução de eletrólitos neutraliza parcialmente a carga negativa da superfície da sílica. O restante da carga é neutralizado por uma camada difusa de cátions mais afastada da superfície da parede do capilar. Na presença do campo elétrico, os cátions desta camada são atraídos para o cátodo, arrastando consigo moléculas de água de hidratação. Esse processo gera um movimento do fluido no interior do capilar na direção do cátodo, chamado de EOF (ALTRIA, 1996) (**Figura 1.5**).

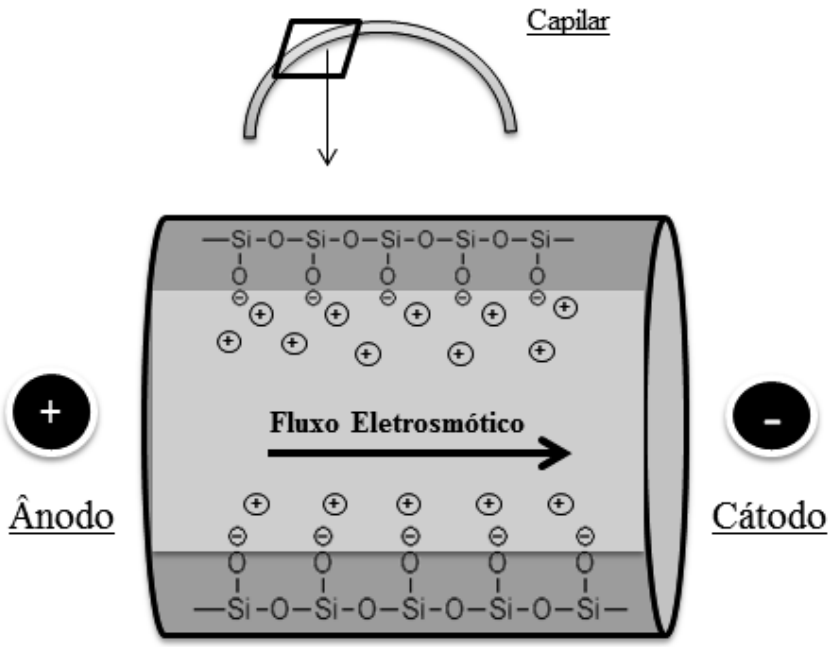


Figura 1.5 Representação do EOF em um capilar de sílica fundida.

O EOF impulsiona espécies carregadas e neutras. A mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}) é diretamente proporcional a densidade de carga na superfície da sílica (medida através do potencial zeta (ζ)). A mobilidade eletrosmótica, dada pela equação a seguir, também está associada com a viscosidade (η) e constante dielétrica (ε) do meio.

$$\mu_{eo} = \left(\frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \right)$$

A velocidade eletrosmótica (V_{eo}) é diretamente proporcional à mobilidade eletrosmótica da solução (μ_{eo}) (ALTRIA, 1996). A equação abaixo apresenta a relação entre a velocidade eletrosmótica e a tensão aplicada (E):

$$V_{eo} = \mu_{eof} \; E$$

Em pH abaixo de 2,0, o EOF pode ser nulo uma vez que os grupos silanóis dos capilares de sílica fundida estão protonados. Neste caso, a migração dos analitos se dará apenas devido à migração eletroforética do analito. Conforme o pH da solução de eletrólitos vai aumentando, a ionização dos grupos silanóis também aumenta, resultando em aumento do EOF. O EOF é significativamente forte em pH maiores ou igual a 7,0, possibilitando inclusive o movimento de espécies carregadas negativamente em direção ao cátodo (ALTRIA, 1996).

O fluxo hidrodinâmico gerado por bombas empregadas em HPLC possui um perfil parabólico, no qual a velocidade do analito é maior no centro do que próximo as paredes (**Figura 1.6**). O perfil do EOF é mais plano resultando em menor dispersão da amostra e, consequentemente, maior eficiência na separação. Essa maior eficiência é a principal vantagem da CE em relação a HPLC, o que possibilita obter separações de amostras complexas em menor tempo (KITAGISHI, 1996).

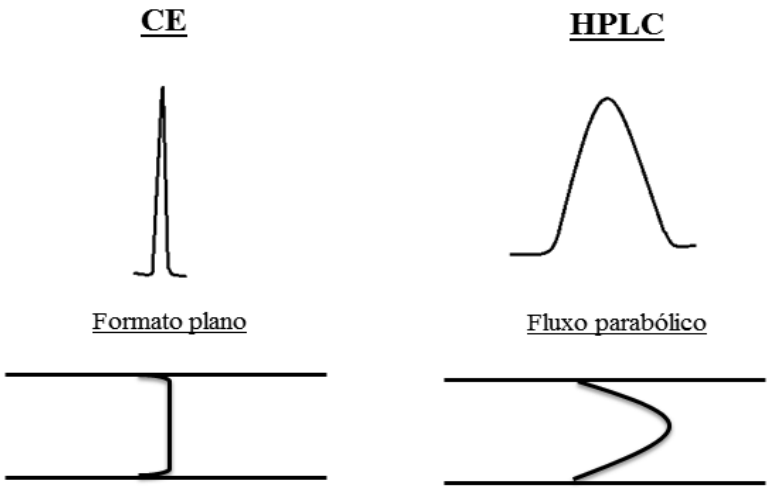


Figura 1.6 Perfil do fluxo eletrosmótico na CE e hidrodinâmico no HPLC (Adaptado de WEINBERGER, 2000).

Para análise de fármacos, essa técnica apresenta como vantagens o seu poder de separação, o uso nulo ou quase nulo de solventes orgânicos, a necessidade de baixas quantidades de amostra e a rapidez da análise. Em contra partida, a obtenção de baixos limites de detecção é dificultada em razão do limitado volume de amostra analisado e do reduzido caminho óptico quando se emprega a detecção por absorção no UV. Essa técnica também apresenta menor precisão da injeção quando comparada aos métodos cromatográficos, mas o uso de padrão interno (*Internal Standard*, IS) elimina esse problema (ISSAQ, 2002; BONATO, 2003, GÜBITZ; SCHMID, 2008).

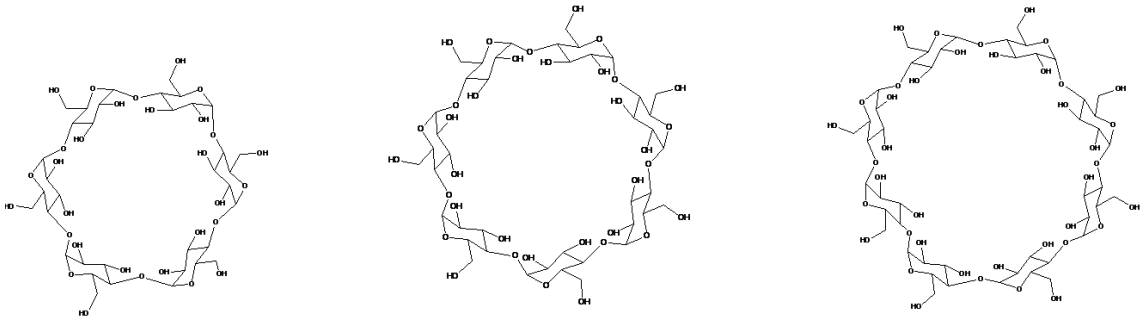
1.2.2.1 Separação de enantiômeros por CE

A separação de enantiômeros por CE é realizada, na maioria das vezes, pela adição de seletores quirais na solução de eletrólitos, resultando na formação de diastereoisômeros transitórios. A separação é obtida devido à diferença de estabilidade das interações dos enantiômeros com o seletor quiral, o que ocasiona diferentes mobilidades tempo-dependentes. Quando o seletor quiral adicionado à solução de eletrólitos é neutro, a separação acontece no modo denominado eletroforese capilar em solução livre (*Free Solution Capillary Electrophoresis*, FSCE), sendo esse modo conveniente para a separação de solutos carregados no pH da solução tampão em que a análise está sendo realizada. Solutos neutros podem ser resolvidos pelo uso de seletores quirais carregados ou seletores não carregados, desde que se tenha no meio um tensoativo não quiral. Esse modo de separação, denominado cromatografia eletrocinética micelar (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), também acontece quando se emprega tensoativos quirais (TERABE; OTSUKA; NISHI, 1994).

1.2.2.2 Seletores quirais

Diversas substâncias são utilizadas como seletores quirais, entre elas, ciclodextrinas (CDs) e seus derivados, éteres de coroa quirais, proteínas, antibióticos macrocíclicos, surfactantes quirais, complexos de troca de ligantes e polissacarídeos de cadeia linear (BLANCO; VALVERDE, 2003). As CDs e seus derivados são os mais usados seguidos pelos antibióticos macrocíclicos, proteínas e polissacarídeos lineares (FANALI, 2000; HADLEY; CAMILLERI; HUTT, 2000).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos que ocorrem naturalmente na natureza. Elas têm o formato de um cone truncado com uma cavidade interna hidrofóbica e extremidades hidrofílicas devido à presença de grupos hidroxilas (posições 2, 3 e 6 da glicopiranose) nas aberturas do cone truncado (BLANCO; VALVERDE, 2003; FANALI, 2000). As CDs nativas mais usadas são α-CD, β-CD e γ-CD. O diâmetro e o volume da cavidade variam de acordo com o número de unidades de glicose no anel da CD. Essas CDs são constituídas por seis (α-CD), sete (β-CD) e oito (γ-CD) unidades de glicopiranose. A **Figura 1.7** apresenta as estruturas químicas da α-CD, β-CD e γ-CD.



α-ciclodextrina **β-ciclodextrina** **γ-ciclodextrina**

Figura 1.7 Estruturas químicas da α-CD, β-CD e γ-CD.

O mecanismo de separação utilizando CDs baseia-se na inclusão do analito na sua cavidade e em interações secundárias do analito com os grupos hidroxilas formando um complexo de inclusão. Para que ocorra a separação quiral, pelo menos uma parte do analito precisa entrar adequadamente na cavidade da CD. Essa interação ocorre de maneira diferente para cada enantiômero (BLANCO; VALVERDE, 2003).

A α-CD possui uma cavidade menor e moléculas menores, com apenas um anel aromático e podem formar complexos de inclusão com ela. A β-CD é a CD com maior poder de resolução quiral. Ela apresenta cavidade apropriada para o reconhecimento quiral de uma grande quantidade de analitos de interesse farmacêutico. A γ-CD é mais apropriada para a enantioseparação de analitos com mais de 3 anéis aromáticos.

Atualmente, uma ampla variedade de derivados de CDs é usada na análise quiral por CE. Esses derivados de CDs surgiram para aumentar a capacidade de discriminação quiral das CDs e também para aumentar a solubilização em água. Esses derivados podem ser neutros ou carregados. Exemplos de derivados neutros são: heptakis-(2,6-di-O-metil)-β-ciclodextrina (DM-β-CD), heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina (TM-β-CD) e hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD). Os derivados de CDs também podem ser carregados negativamente (β-ciclodextrina carboximetilada (CM-β-CD), β-ciclodextrina sulfatada (S-β-CD) e sulfobutiléter-β-ciclodextrina (SBE-β-CD)), positivamente (2-hidroxipropil-3-trimetil amônio-β-ciclodextrina (QA-β-CD)) ou anfóteros (2-cloreto de hidroxipropil-trimetil amônio-β-ciclodextrina) (BLANCO; VALVERDE, 2003, GÜBITZ; SCHMID, 2000).

1.3 TÉCNICAS EMPREGADAS PARA A PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

O processo de extração de fármacos e metabólitos presentes em amostras biológicas constitui uma etapa importante no desenvolvimento de um método analítico. As matrizes biológicas são extremamente complexas e contêm uma grande variedade de compostos orgânicos como proteínas, carboidratos, lipídeos, íons, etc. Desta forma, a detecção de fármacos em matrizes como urina, plasma, soro, sangue total, homogenatos de tecidos, cabelo, saliva, entre outros, geralmente requer procedimentos de pré-tratamento da amostra antes da análise instrumental (DE OLIVEIRA et al., 2008, HADLEY; CAMILLERI; HUTT, 2000).

Além de eliminar possíveis interferentes da matriz, o processo de preparação da amostra tem ainda a finalidade de concentrar o analito que está sendo estudado, já que na maioria das vezes, fármacos e metabólitos estão presentes em concentrações da ordem de ng mL^{-1}. A preparação da amostra também tem por finalidade transferir o analito para um meio compatível com a técnica de análise escolhida (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A extração líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) é a técnica mais comumente utilizada para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em matrizes biológicas (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; BONATO, 2003; DE OLIVEIRA et al., 2008). Em segundo lugar destaca-se a extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction,* SPE). Essas duas técnicas foram empregadas no desenvolvimento dos métodos de análise da ZO e de seus metabólitos e, portanto, serão discutidas em detalhes. Nos últimos anos observa-se uma tendência de miniaturização dos procedimentos de preparação de amostras e com isso, surgiram várias novas técnicas de extração como a microextração em fase sólida (S*olid-Phase Microextraction,* SPME*) e a* microextração em fase líquida com membranas cilíndricas ocas (*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction,* HF-LPME) (HADLEY; CAMILLERI; HUTT, 2000; DE OLIVEIRA et al., 2008). As técnicas de microextração buscam a utilização de quantidades mínimas de solventes orgânicos para o desenvolvimento de métodos menos agressivos ao meio-ambiente, com menor desperdício (DE OLIVEIRA et al., 2008; WILLE; LAMBERT, 2007).

1.3.1 Extração Líquido-Líquido

A LLE é um procedimento de extração clássico, amplamente empregado devido a sua alta eficiência e seu baixo custo. O mecanismo de extração baseia-se no fenômeno da partição dos componentes da amostra entre a fase aquosa e orgânica. Desta forma, a eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração. Além disso, o valor do pH da fase aquosa e a relação do volume das fases orgânica e aquosa influenciam esse processo de extração (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; ERNY; CIFUENTES, 2006).

Na LLE, o caráter ácido-básico do analito de interesse e sua estabilidade devem ser considerados. Para uma extração eficiente, o analito deve estar na sua forma não ionizada, portanto, a amostra deve ser acidificada ou alcalinizada quando da análise de solutos ácidos e básicos, respectivamente. Outro fator importante é a lipofilicidade ou a hidrofobicidade do analito, uma vez que esta ajuda na escolha do solvente extrator. O valor da constante de distribuição (K_D) entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH (prevenir a ionização de ácidos ou bases), pela formação de pares iônicos com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros que levam a uma diminuição da solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa.

As principais vantagens da LLE são sua simplicidade, baixo custo e a possibilidade de utilizar um grande número de solventes extratores. Em contrapartida, o principal inconveniente dessa técnica de extração é a grande quantidade de solventes orgânicos que é empregada. Outros problemas da LLE ocorrem quando da extração de solutos com alta afinidade pela água visto que, nesse caso, eles são parcialmente extraídos pelo solvente orgânico. Além disso, impurezas do solvente são concentradas junto com os solutos durante a etapa de eliminação do solvente orgânico usado na extração, implicando na necessidade do uso de solventes ultra puros. Outro problema está relacionado com possibilidade de formação de emulsões, que dificultam a recuperação do analito e resultam em grande consumo de tempo (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

1.3.2 Extração em fase sólida

A SPE é outra poderosa ferramenta de extração. Essa técnica utiliza cartuchos de polipropileno, geralmente na forma de uma seringa, preenchidos com sorventes com partículas de 40-60 µm. Esse sorvente é mantido no tubo entre dois filtros e é responsável pela retenção das substâncias.

O procedimento de extração por SPE inicia-se com a ativação do sorvente. Essa ativação deixa os sítios ativos disponíveis para interagir com os compostos que serão extraídos. Após essa etapa, ocorre o condicionamento do sorvente com um solvente adequado de tal forma a ajustar a força do sorvente e a força do solvente da amostra. A amostra é então introduzida no cartucho. Em seguida, o cartucho é lavado com um solvente apropriado para retirada de interferentes e depois com um solvente capaz de eluir os compostos desejados. (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Os sorventes mais empregados na SPE são similares aos usados em cromatografia classica como, por exemplo, carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas com grupos apolares (C8, C18), polares (Diol) ou carregados (sulfopropil) e polímeros. Portanto, os mecanismos de retenção são os mesmos: fase reversa, fase normal e troca iônica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A busca por extrações altamente seletivas originou o desenvolvimento de novos materiais como, por exemplo, sorventes por imunoafinidade, nos quais o suporte de sílica é ligado a um anticorpo. Outro material bastante atraente é o polímero impresso molecularmente (MIP). Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros sintéticos com sítios de reconhecimento específicos. Esses polímeros possuem uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos. Os sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor das moléculas do analito. Os complexos formados entre o analito e o monômero precursor, através de interação molecular, são fixados com reações de polimerização. Ao remover o analito da matriz polimérica, formam os sítios de reconhecimento que possuem afinidade pelo analito (WILLE; LAMBERT, 2007; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001)

Outra tendência na SPE é a automatização dos métodos. Vantagens como, maior precisão e exatidão, maiores transferências de amostra, menor tempo, menor intervenção e consequente menores erros sistemáticos são observadas com a automatização dos procedimentos de extração (WILLE; LAMBERT, 2007).

Objetivo Geral

2. Objetivo Geral

Desenvolver métodos para análise enantiosseletiva da ZO, metabólitos e impurezas em formulações farmacêuticas e materiais biológicos.

Para atender esse objetivo, a técnica LC-MS-MS foi empregada para o desenvolvimento do método de análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos em plasma de ratos (Capítulo 3) e para análise da ZO em cérebro de ratos (Capítulo 4). Os métodos desenvolvidos foram aplicados em um estudo piloto de disposição cinética em ratos. Por outro lado, a CE foi empregada no desenvolvimento de um método enantiosseletivo para quantificação simultânea da ZO e suas impurezas, com aplicação no controle de qualidade de formulações farmacêuticas e no estudo da degradação e racemização do fármaco (Capítulo 5).

Análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos em plasma de ratos

3. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA ZO E SEUS METABÓLITOS EM PLASMA DE RATOS

3.1 INTRODUÇÃO

Estudos mostram que as enzimas CYP 3A4 e CYP 2C8 contribuem significativamente para a metabolização *in vitro* da ZO (**Figura 3.1**). Os metabólitos principais são a N-Des e o N-Ox (BECQUEMONT et al., 1999). A farmacocinética da ZO é descrita como sendo estereosseletiva após a administração oral (PIPERAKI; PARISI-POULOU, 1996; FERNANDEZ et al., 1991; 1993 e 2002). Maiores concentrações do enantiômero (+)-(S)-ZO foram descritas por diversos autores em diferentes matrizes, tais como plasma (FERNANDEZ et al., 1991; FOSTER et al.,1994) e urina de voluntários sadios (FERNANDEZ et al.,1993) e no plasma e no cérebro de ratos (FERNANDEZ et al., 2002). Maiores concentrações dos enantiômeros (+)-(S)-N-Des e (+)-(S)–N-Ox também foram relatados na literatura (PIPERAKI; PARISI-POULOU, 1996; FERNANDEZ et al.,1991, 1993 e 2002).

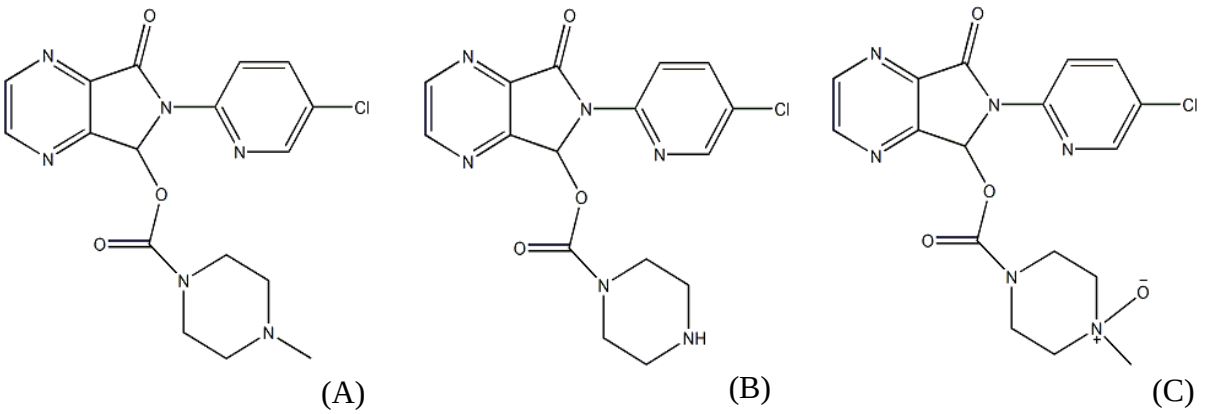


Figura 3.1 Estruturas químicas da zopiclona (A), e dos seus metabólitos N-desmetilzopiclona (B) e zopiclona N-óxido (C).

Desta forma, a fim de monitorar os estudos clínicos, avaliar as propriedades farmacocinéticas e realizar estudos de biotransformação deste fármaco, diferentes métodos bioanalíticos, quirais e não-quirais, têm sido descritos na literatura para determinar a concentração de ZO e / ou de seus metabólitos em matrizes biológicas.

A cromatografia líquida com detecção por fluorescência (FERNANDEZ et al., 1991 e 1993, FOSTER et al.,1994; STANLEY; MITCHELL; KAYE, 1985; GEBAUER; ALDERMAN, 2002; NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA , 2006), UV-Vis (ROYER-MORROT et al., 1992; PAW; MISZTA 2000) e MS (BADAWI et al., 2009; GJERDE et al., 2010) tem sido utilizada para a quantificação da ZO no plasma humano (FERNANDEZ et al., 1991; FOSTER et al.,1994; STANLEY; MITCHELL; KAYE, 1985; GEBAUER; ALDERMAN, 2002; NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA, 2006; ROYER-MORROT et al., 1992, PAW; MISZTA 2000), urina humana (FERNANDEZ et al.,1993) e plasma e cérebro de ratos (FERNANDEZ et al., 2002). Alguns métodos foram capazes de quantificar também os metabólitos da ZO (FERNANDEZ et al., 1993; NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA , 2006)

A análise enantiosseletiva da ZO foi primeiramente relatada por Fernandez et al., em 1991. Este método permite a análise dos enantiômeros da ZO no plasma humano, utilizando uma coluna aquiral (cianopropil) para separar o fármaco dos outros componentes da matriz e uma coluna quiral (fase estacionária baseada em um carbamato de celulose) para separação dos enantiômeros.

Em 1993 esses autores relataram outro método que utilizou as mesmas colunas para a análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos na urina, empregando detecção por fluorescência. Os limites de quantificação foram 10, 15 e 10 ng mL^{-1} para ZO, N-Des e N-Ox, respectivamente. Este método foi utilizado para investigar a disposição cinética dos enantiômeros da ZO, N-Ox e N-Des após a administração oral de uma dose única de 15 mg de ZO racêmica a 12 voluntários caucasianos do sexo masculino. Neste trabalho, os autores descreveram a determinação da ZO não só na urina, mas também no plasma, embora a determinação dos metabólitos da ZO tenha sido realizada somente na urina.

O mesmo método foi utilizado novamente, pelo mesmo grupo, para avaliar a racemização da ZO em matrizes biológicas e estudar a distribuição estereosseletiva da ZO no plasma e no cérebro de ratos (FERNANDEZ et al., 2002). ZO foi extraída do plasma e cérebro de ratos por LLE usando diclorometano:isopentano: isopropanol (50:47,5:2,5, v/v/v) como solvente extrator. A recuperação obtida foi de 87,9% e 94,4% para cada enantiômero da ZO das amostras de plasma e 75,4% e 73,3% para cada enantiômero ZO das amostras de cérebro.

A fim de detectar os enantiômeros da ZO no plasma humano, Foster et al. (1994) descreveram um método usando uma coluna Chiralcel OD-H, etanol:hexano (60:40, v/v) como fase móvel e detecção por fluorescência. ZO foi extraída por LLE utilizando éter metil-terc-butila:isooctano (75:25, v/v). Os metabólitos não foram estudados no método relatado por este grupo. Gebauer e Alderman (2002) relataram uma modificação nesse método usando um análogo da ZO como padrão interno, melhorando o método previamente publicado.

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS-MS) tem sido utilizada para determinar ZO em diferentes matrizes com limites de detecção tão baixos quanto 0,025 ng mL^{-1} (MISTRI et al., 2008; TORNIO; NEUVONEN; BACKMAN, 2006). No entanto, a análise simultânea de ZO e seus metabólitos (N-Des e N-Ox) por LC-MS-MS é descrita em apenas um trabalho (MISTRI et al., 2008). Além disso, esses métodos descritos na literatura são não enantiosseletivos.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver e validar um método de análise enantiosseletiva para quantificação simultânea da ZO e seus metabólitos em plasma empregando LC-MS-MS, com aplicação em um estudo piloto de disposição cinética em ratos.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Reagentes e solventes

Acetonitrila (ACN), etanol e metanol foram comprados da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido acético glacial foi obtido da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), o diclorometano da Chemis (São Paulo, SP, Brasil) e o isopropanol da Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, EUA). Todos os solventes utilizados no preparo da fase móvel foram grau HPLC. Os reagentes utilizados no preparo das soluções tampão, fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram grau analítico. A água utilizada nos experimentos foi purificada no sistema Milli-Q Plus System (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os aditivos orgânicos dietilamina (DEA) obtido da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA), e a trietilamina (TEA), obtida da Acros Organics (Fair Lawn, NJ, EUA), foram grau analítico.

3.3.1.2 Soluções-padrão

A ZO foi gentilmente fornecida pela Arrow Farmacêutica LTDA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e seus metabólitos foram adquiridos da Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). A moclobemida (MO), utilizada como padrão interno, foi gentilmente cedida pela Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha).

As soluções-padrão de ZO e seus metabólitos utilizadas na avaliação das colunas quirais foram primeiramente preparadas em metanol, na concentração de 100 µg mL^{-1}, e armazenadas à temperatura de -20 °C sob proteção da ação da luz. Devido à rápida degradação em metanol, as soluções-padrão de ZO, N-Ox e N-Des passaram então a ser preparadas em ACN. Os padrões de calibração usados na validação e aplicação do método foram preparados através da diluição apropriada destas soluções-padrão em ACN na faixa de concentração de 0,15 - 10,0 µg mL^{-1} para cada enantiômero. Para obtenção das curvas analíticas, alíquotas de 0,5 mL de plasma branco (plasma de ratos livre do fármaco e metabólitos) foram fortificadas com 25 µL dos padrões de calibração, obtendo-se as concentrações plasmáticas de 7,5, 25, 50, 75, 100, 150, 250 e 500 ng mL^{-1} de cada enantiômero. As amostras-controle (QC) foram preparadas pela adição dos padrões de calibração a plasma branco para obter concentrações de 20 (QC-baixo), 200 (QC-médio) e 400 ng mL^{-1} (QC-alto) de cada enantiômero. A solução de MO utilizada como padrão interno foi preparada em metanol na concentração de 1 µg mL^{-1}.

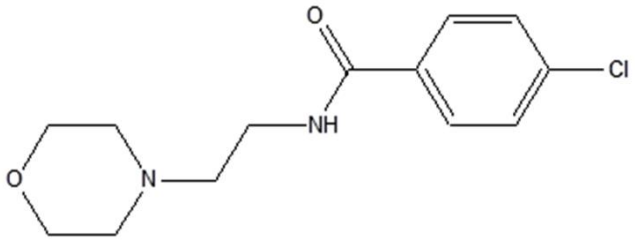


Figura 3.2 Estrutura química da moclobemida utilizada como padrão interno.

3.3.1.3 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos machos Wistar com cerca de 200 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e umidade controladas, com ciclos de 12 horas luz/escuro e com livre acesso à água e alimentação padronizada à espécie, até 12 horas antes do experimento.

O plasma utilizado no desenvolvimento e validação do método foi obtido de ratos machos Wistar. Os animais foram decapitados e as amostras de sangue coletadas em tubos heparinizados (Liquemine 25.000 UI, Roche, Rio de janeiro, RJ, Brasil). Os plasmas foram separados por centrifugação a 2000g por 15 minutos e armazenados a −20 ºC e sob proteção da luz até a análise.

3.3.1.4 Equipamentos e acessórios

Na etapa inicial do estudo empregou um equipamento de cromatografia líquida acoplado a um detector por absorção no UV-VIS. O equipamento (Shimadzu, Kyoto, Japan) era constituído por uma bomba LC10AS, um sistema controlador modelo SLC 10A, um injetor Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) com amostrador de 50µL e um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A. O controle do sistema cromatográfico e a aquisição dos dados foram feitos empregando o software LCsolution® versão 1.22 SP1.

Depois de definidas as condições cromatográficas, o método foi desenvolvido e validado empregando o sistema LC-MS-MS. O sistema cromatográfico utilizado (Shimadzu, Kyoto, Japan) era constituído por duas bombas LC10AD, um sistema controlador modelo SLC 10A, um forno modelo CTO 10AS e um injetor Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) com amostrador de 20µL. O espectrômetro de massas utilizado como detector foi um triplo quadrupole (Quatro LC, Micromass, Manchester, UK) com uma interface ESI, empregada no modo positivo. A aquisição e processamento dos dados foi efetuada através do software Micromass MassLynx, versão 4.1.

As temperaturas da fonte de ionização e de dessolvatação foram mantidas em 80 °C e 250 °C, respectivamente. O nitrogênio foi usado como gás de secagem e nebulização na vazão de 265 L h^{-1}. O argônio foi usado como gás de colisão. O efluente da coluna foi dividido por uma válvula Valco (Restek, Pennsilvania, PA, EUA) e aproximadamente 0,2 mL min^{-1} foram introduzidos na fonte de ionização.

No preparo das soluções-padrão empregou-se balança analítica Sartorius AG modelo CP225D (Sartorius, Santo André, SP, Brasil), ultrasson Thornton modelo Ultrasonic clear 1450 (Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e agitador magnético modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). Para medida do pH das soluções-tampão foi utilizado um pHmetro Orion modelo 420A+ (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EUA). No processo de extração foi utilizado um agitador Pachane modelo PA241 (Piracicaba, SP, Brasil) e uma centrifuga refrigerada Himac CF5RX (Hitashi, São Paulo, SP, Brasil).

3.3.1.5 Colunas cromatográficas quirais e coluna guarda

A separação dos enantiômeros da ZO e de seus metabólitos foi avaliada em diferentes colunas com fases estacionárias baseadas em derivados de amilose, polimetacrilato e no antibiótitico vancomicina, de acordo com as especificações abaixo. Depois de a separação ter sido otimizada, todas as demais análises foram feitas empregando uma coluna de guarda Lichrospher CN (4 x 4 mm, partículas de 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha).

- Coluna CHIRALPAK AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose recobrindo partículas de sílica de 10 µm.

- Coluna CHIRALPAK AD-RH (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose recobrindo partículas de sílica de 5 µm.

- Coluna CHIRALPAK AS (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris [(S)-1-fenilcarbamato] de amilose recobrindo partículas de sílica de 10 µm.

- Coluna CHIRALCEL OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose recobrindo partículas de sílica de 5 µm.

- Coluna CHIRALCEL OJ (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (4-metilbenzoato) de celulose recobrindo partículas de sílica de 10 µm.

- Coluna CHIRALCEL OG (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (4 metilfenilcarbamato) de celulose recobrindo partículas de sílica de 10 µm.

- Coluna CHIRALPAK OP (+) (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo polímero polimetacrilato recobrindo partículas de sílica de 10 µm.

- Coluna CHIROBIOTIC V (150 x 4,6 mm, Advanced Separation Technologies (ASTEC), Whippany, NJ, EUA), constituída pelo antibiótico macrocíclico vancomicina ligado a partículas de sílica de 5 µm.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Avaliação das colunas quirais

As colunas CHIRALPAK AD, CHIRALPAK AD-H, CHIRALPAK AS, CHIRALCEL OD-H, CHIRALCEL OJ, CHIRALCEL OG e CHIRALPAK OP (+) foram avaliadas em fase normal. As fases móveis empregadas foram misturas de hexano e diferentes solventes orgânicos polares (metanol, etanol e isopropanol). A adição de TFA e DEA a essas fases móveis também foi avaliada com o objetivo de melhorar a simetria dos picos e, consequentemente, a resolução dos enantiômeros.

As colunas CHIROBIOTIC V e CHIRALPAK AD-RH foram avaliadas em fase reversa e no modo polar orgânico. Para as separações em fase reversa, utilizaram-se misturas de água ou soluções tampão e solventes orgânicos polares (acetonitrila, metanol). Para as separações no modo polar orgânico foram utilizados metanol, etanol e acetonitrila, separados ou combinados entre si. A adição de TFA e DEA a essas fases móveis também foi avaliada.

As fases móveis empregadas no modo fase normal e polar orgânico foram preparadas pela simples mistura dos componentes e sua homogeneização. Para obtenção das fases móveis empregadas no modo reverso, os componentes aquosos foram filtrados em membrana Millipore de 0,45 µm e a fase móvel depois de pronta foi degaseificada por 15 minutos (ultrassom e vácuo). A vazão empregada foi ajustada conforme a viscosidade da fase móvel a fim de se evitar que a pressão gerada ultrapassasse o limite permitido para cada coluna e, ao mesmo tempo, evitar que a análise se tornasse muito longa. As análises foram efetuadas a temperatura ambiente (25 ºC).

Após o condicionamento com a fase móvel desejada, as colunas foram avaliadas pela análise de soluções-padrão dos analitos preparadas na fase móvel (25 µL das soluções-padrão dos analitos foram secas sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de fase móvel). O parâmetro usado para avaliação da separação foi a resolução (Rs), calculada segundo a equação; (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997):

$$Rs = 2\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Onde, t_{R2} é o tempo de retenção do enantiômero mais retido e t_{R1} do menos retido. w_{b1} e w_{b2} são as respectivas larguras das bases dos picos, calculadas pelo método da tangente.

3.3.2.2 Otimização da detecção

A otimização da detecção (MS-MS) foi feita através da infusão direta de soluções-padrão dos analitos (100 µg mL^{-1}) preparadas na fase móvel, usando uma bomba de infusão, na vazão de 20 µL min^{-1}.

A voltagem do cone foi definida em 20 V para a ZO e N-Des, 18 V para N-Ox e 23 V para o padrão interno. A energia de colisão foi de 20 eV para a ZO e seus metabólitos e 15 eV para o padrão interno. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM) das moléculas protonadas $[M + H]^+$ e seus respectivos fragmentos com um tempo de permanência de 0,4 s. As transições monitoradas foram: m/z 389 > 245 para ZO, m/z 375 > 245 para N-Des, m/z 405 > 143 para N-Ox e m/z 269 > 182 para MO. A infusão pós-coluna de solução de ácido acético aquoso 1% foi utilizada na vazão de 0,25 mL min^{-1} para melhorar a detecção.

3.3.2.3 Ordem de eluição

Depois de otimizadas as condições de separação, a ordem de eluição dos enantiômeros da ZO e de seus metabólitos foi determinada baseada no trabalho de Mannaert e Daenens (1996). Primeiramente, foram coletadas alíquotas separadas de cada enantiômero empregando o método desenvolvido nesse trabalho. Essas frações foram secas, dissolvidas em fase móvel e injetadas nas condições descritas por Mannaert e Daenens (1996).

3.3.2.4 Procedimento de preparação da amostra

A otimização do processo de extração da ZO e seus metabólitos do plasma foi avaliada utilizando a LLE. Alíquotas de 0,5 mL de plasma de rato foram fortificadas com 25 µL das soluções-padrão dos analitos na concentração de 100 µg mL^{-1} de cada enantiômero. Em seguida, o pH foi ajustado com tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} (6,0, 7,0 ou 8,0) e a extração foi feita com 4 mL de um solvente orgânico (tolueno, diclorometano, acetato de etila, isopropanol e éter etílico), sob agitação mecânica durante 20 minutos e a temperatura ambiente. A separação das fases foi feita por centrifugação a 2000xg por 10 minutos a 4ºC. As fases orgânicas foram coletadas e evaporadas a secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 50 µL de fase móvel e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico.

O efeito do pH do tampão fosfato de sódio também foi avaliado com os enantiômeros isolados da ZO e seus metabólitos para avaliar a possibilidade de racemização dos compostos.

3.3.2.5 Validação do método

Após a otimização do método de extração e definição dos parâmetros cromatográficos procedeu-se a validação do método avaliando os principais parâmetros recomendados pelas agências regulamentadoras para análise de fármacos em fluidos biológicos (FDA, 2011; Anvisa, 2003).

A curva analítica foi preparada diariamente empregando alíquotas de plasma branco fortificado com soluções-padrão de ZO, N-Des e N-Ox, em triplicata, nas concentrações de 7,5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 250 e 500 ng mL^{-1} de cada enantiômero. As curvas foram avaliadas através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. Para avaliar numericamente a qualidade do ajuste do modelo, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com teste unilateral, $p < 0,05$.

O efeito da matriz na ionização dos analitos foi avaliado comparando a área dos picos dos enantiômeros da ZO, N-Des e N-Ox de soluções-padrão com as áreas dos picos desses analitos fortificados em extrato de plasma branco. O efeito da matriz foi avaliado em triplicata nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação (7,5 ng mL^{-1}), amostra-controle baixa (20 ng mL^{-1}) e amostra-controle alta (400 ng mL^{-1}) de cada analito. Também foi avaliado o efeito de matriz na detecção do padrão interno na concentração utilizada na validação (1 µg mL^{-1}). Os valores de efeito de matriz foram expressos como erro relativo (E (%)) e coeficiente de variação percentual (CV (%)).

O limite de quantificação (LOQ) é definido como a menor concentração que pode ser quantificada com precisão (CV (%)) e exatidão (E (%)) abaixo de 20%. O LOQ foi determinado avaliando amostra de plasma de ratos fortificada com 7,5 ng mL^{-1} de cada enantiômero da ZO e seus metabólitos.

A eficiência do processo de extração foi determinada comparando as áreas dos picos de soluções-padrão submetidas à extração com áreas dos picos de soluções-padrão não submetidas à extração. A recuperação foi avaliada pela análise de plasma de rato fortificado com 20, 200 e 400 ng mL^{-1} de cada enantiômero de cada analito, em triplicata. A recuperação foi expressa como porcentagem da quantidade extraída.

A precisão e exatidão intraensaio foram avaliadas analisando amostras de plasma branco fortificadas com os analitos nas concentrações baixa, média e alta (20, 200 e 400 ng mL^{-1} de cada enantiômero). Foram feitas cinco determinações em cada nível de concentração. As concentrações dos enantiômeros foram determinadas empregando uma curva analítica preparada no mesmo dia da análise.

A precisão e exatidão interensaios foram verificadas pela análise dos controles (n = 5 para cada concentração) citados acima durante três dias. A cada dia de análise foi preparada uma nova curva analítica. Os critérios de aceitação foram a obtenção de coeficientes de variação e erros relativos inferiores a 15 %.

A estabilidade da ZO e seus metabólitos em plasma de ratos foi avaliada pela análise, em triplicata, de amostras de plasma fortificadas nas concentrações de 20 e 400 ng mL^{-1} de cada enantiômero. A estabilidade de bancada foi avaliada mantendo as amostras na bancada à temperatura ambiente por 3 h (25 °C). A estabilidade frente ao ciclo de congelamento e descongelamento foi avaliada através de três ciclos. Estas amostras foram armazenadas a -20 º C por 24 h e descongeladas à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 12 h nas mesmas condições. Depois disso, elas foram descongeladas e analisadas. Outras amostras nas mesmas concentrações foram armazenadas a -20 ºC durante cinco dias para avaliar a estabilidade em longo prazo. Em todas as condições descritas, as áreas dos picos obtidas a partir de ensaios de estabilidade foram comparadas com as áreas dos picos obtidas com as amostras preparadas na hora. A estabilidade das soluções-padrão durante o período de estudo foi avaliada utilizando a concentração média e o padrão interno na sua concentração de estudo. Estes foram analisados em triplicata durante os experimentos e suas áreas comparadas com as áreas obtidas em solução recém-

preparadas. As amostras foram consideradas estáveis quando o desvio (E%) fosse inferior a 15%.

No estudo da robustez do método, avaliou-se a influência de pequenas variações nas condições previamente selecionadas. Os fatores avaliados foram a concentração de DEA na fase móvel (0,026% e 0,024%), temperatura da fonte de ionização (82 ˚C e 78 ˚C), vazão da fase móvel (1,1 mL min^{-1} e 0,9 mL min^{-1}) e composição da fase móvel (etanol:metanol:ACN, 51:44:5, v/v/v + 0,025% DEA e etanol:metanol:ACN 49:46:5, v/v/v + 0,025% DEA). A influência desses fatores foi avaliada usando um procedimento experimental de 2 níveis (2^{4-1}, 8 experimentos). As respostas avaliadas nos experimentos foram: resolução, área do pico e tempo de análise. As respostas obtidas foram processadas pelo Minitab 14 statistical software (State College, EUA) a fim de determinar a significância dessas variáveis analíticas.

3.3.2.6 Aplicação do método

O método validado foi empregado em um estudo piloto de disposição cinética em ratos. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas, recebendo apenas água antes do experimento. Para a aplicação do método, esses animais receberam, por gavagem, 0,5 mL de ZO dissolvida em solução aquosa de vinagre a 5%, na dose de 3 mg kg^{-1}.

Os animais foram decapitados e as amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados (Liquemine 25.000 UI, Roche, Rio de janeiro, RJ, Brasil) nos tempos 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360 e 480 minutos após administração de ZO (n = 6 ratos por tempo de análise). Os plasmas foram separados por centrifugação a 2000g por 15 minutos e armazenados a −20 ºC e sob proteção da luz até a análise. O estudo foi aprovado e realizado em acordo com o Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão preto, protocolo 09.1.1175.53.0 (Anexo 1).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Separação quiral

O método de separação dos enantiômeros da ZO e de seus metabólitos foi primeiro desenvolvido no LC-UV e depois transferido para o LC-MS-MS. Nessa etapa do desenvolvimento, a detecção foi feita utilizado o comprimento de onda de absorção máxima da ZO, 305 nm. A vazão empregada foi ajustada conforme a viscosidade da fase móvel, a fim de evitar que a pressão gerada ultrapassasse o limite de cada coluna e, ao mesmo tempo, que a análise se tornasse muito longa. Todas as análises foram efetuadas a temperatura ambiente (25 ºC).

Os experimentos iniciais foram feitos empregando uma solução de ZO preparada em metanol. Entretanto, quando uma solução de ZO preparada nesse solvente e estocada no freezer a -20ºC, protegida da luz, por um mês, foi analisada empregando a coluna CHIRALPAK AD, observou-se a separação de outros quatro picos. Uma solução-padrão recém preparada e analisada nas mesmas condições resultou em apenas dois picos (**Figura 3.3**). Esse resultado mostrou que a solução de ZO estava sendo descomposta em metanol e, a partir daí, passou-se a empregar soluções de ZO preparadas em ACN. Nesse solvente as soluções foram estáveis por pelo menos seis meses.

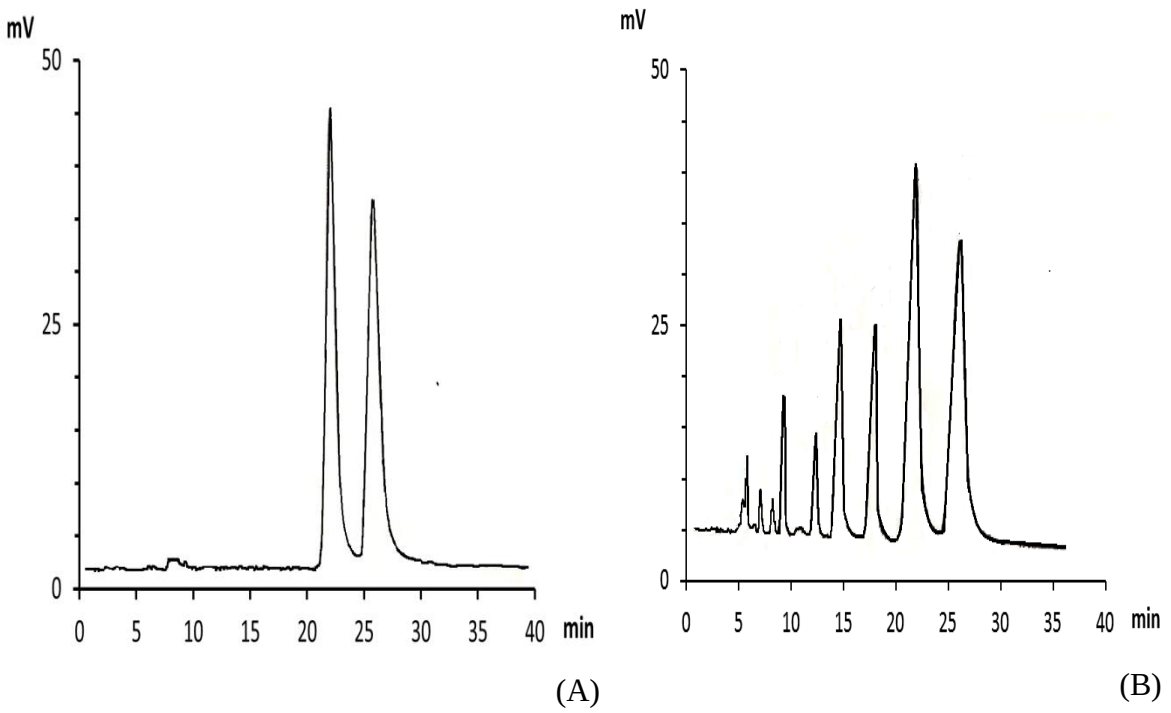


Figura 3.3: Cromatogramas da solução-padrão (100 µg mL^{-1}) de ZO recém preparada em metanol (A) e estocada a -20 ºC por um mês (B). Coluna CHIRALPAK AD, fase móvel constituída por hexano:isopropanol (6:4, v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305 nm.

As colunas CHIRALCEL OJ, CHIRALCEL OG, CHIRALPAK OP (+) e CHIRALPAK AS foram avaliadas em condições de fase normal, mas não proporcionaram separação da ZO em 30 minutos de análise. A separação completa dos isômeros da ZO foi obtida nas colunas CHIRALPAK AD (Figura 3.3.), CHIRALPAK AD-H e CHIRALCEL OD–H (**Figura 3.4**).

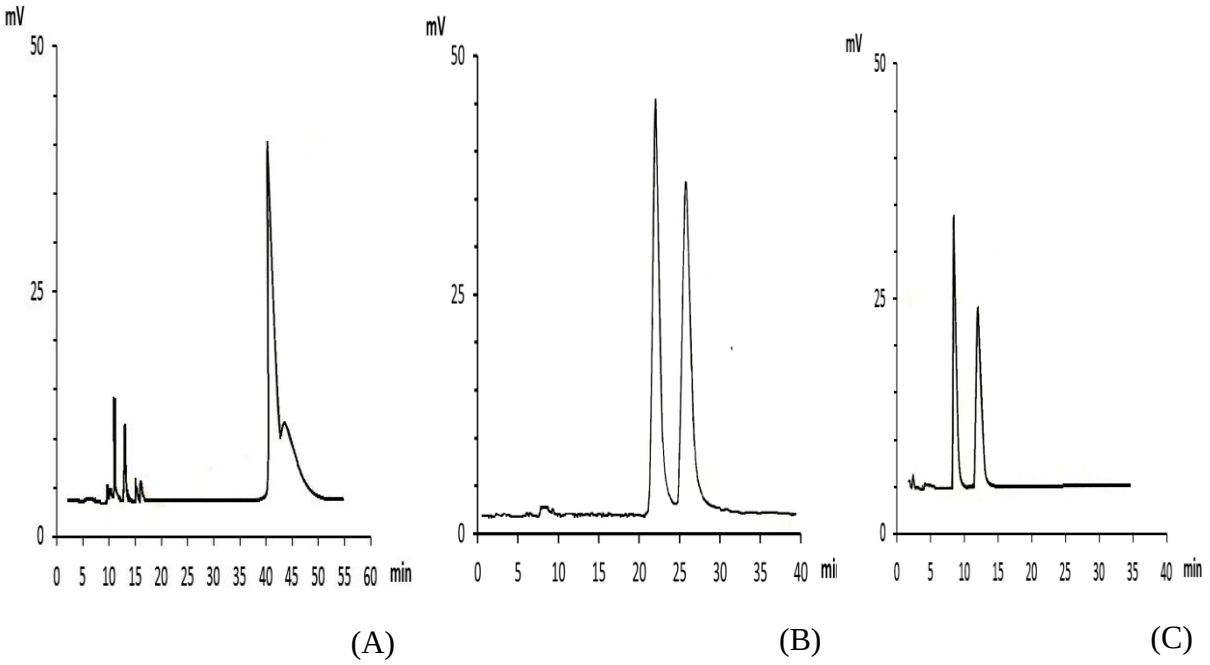


Figura 3.4 Cromatogramas referentes à análise da ZO na concentração de 100 µg mL^{-1} nas colunas CHIRALPAK AD- H (A e B) e CHIRALCEL OD- H (C). Vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305 nm. Fases móveis: (A) hexano:etanol (6:4, v/v), (B) hexano:isopropanol (6:4, v/v) e (C) hexano:etanol (4:6, v/v).

Os cromatogramas da **Figura 3.4** mostram que o tipo de álcool empregado na composição da fase móvel tem um importante efeito na resolução dos enantiômeros da ZO e esse efeito depende da fase estacionária usada. Assim, o etanol não foi adequado para a resolução dos enantiômeros na coluna CHIRALPAK AD-H (tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose), mas foi excelente para a separação na coluna CHIRALCEL OD-H (tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose).

Foram avaliadas diversas modificações nessas fases móveis buscando obter também a separação dos metabólitos N-Des e N-Ox em fase normal. Como não foi possível obter essa separação, outras colunas foram avaliadas em modo polar orgânico e modo reverso (CHIROBIOTIC V e CHIRALPAK AD-RH).

Empregando a coluna CHIROBIOTIC V, só foi possível obter separação parcial dos enantiômeros da ZO em condição de fase reversa (**Figura 3.5**). Portanto, a avaliação da separação dos enantiômeros dos metabólitos nessa coluna foi descartada.

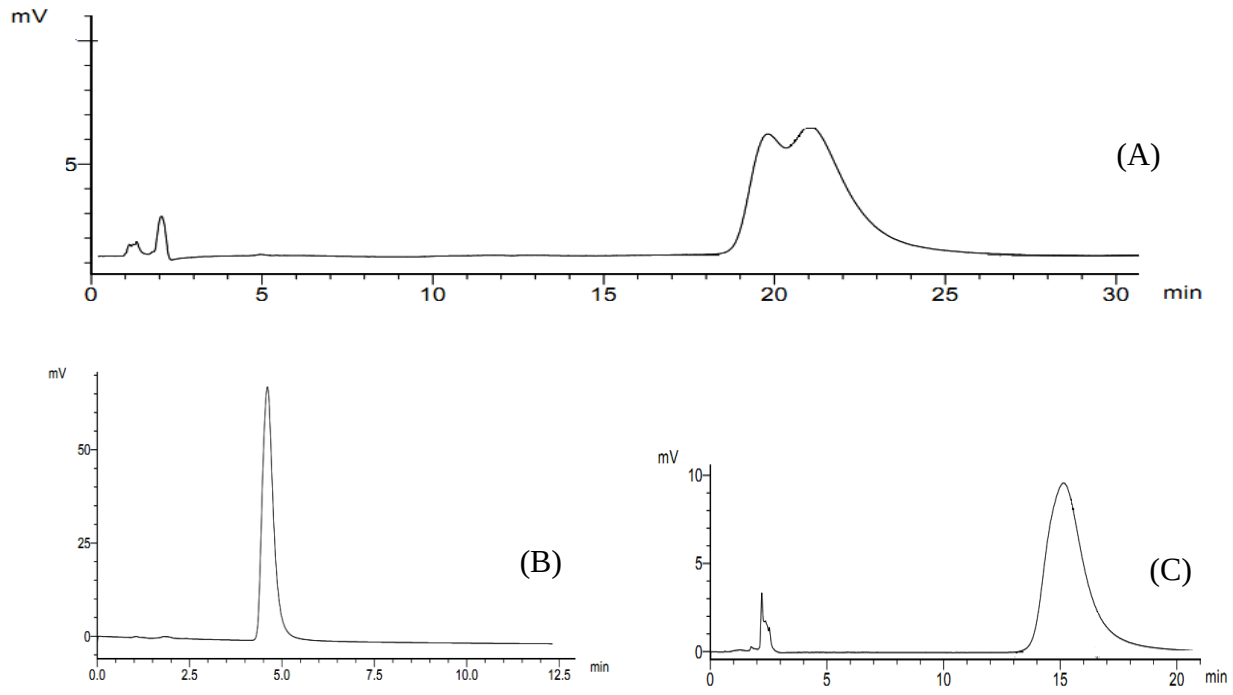
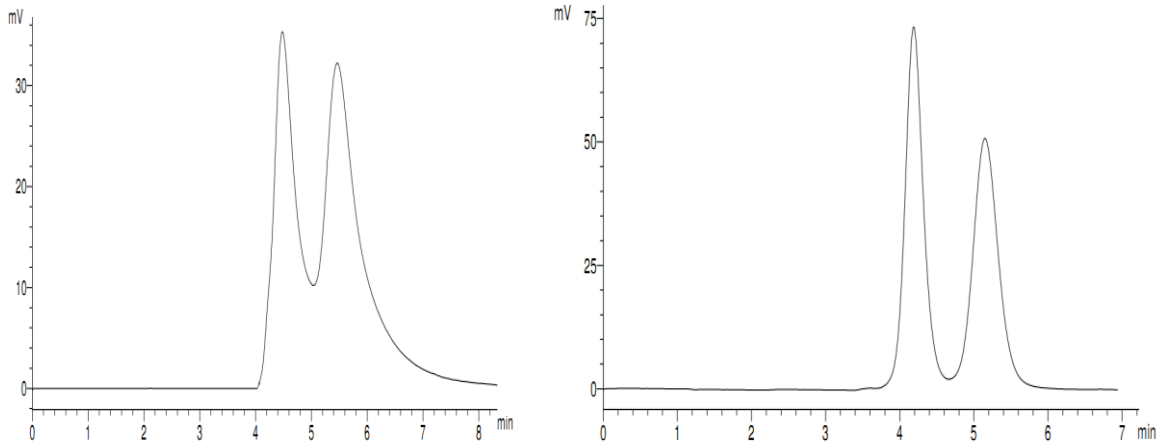


Figura 3.5 Cromatogramas referentes à análise da ZO na concentração de 100 ug mL^{-1} na coluna CHIROBIOTIC V. Vazão de 1,0 mL min^{-1}, detecção em 305 nm. Fases móveis: (A) metanol:água (7:3, v/v), 0,05 DEA, (B) metanol 100%, 0,05 DEA e (C) acetonitrila 100%, 0,05 DEA.

A separação da ZO e seus metabólitos no modo polar orgânico foi obtida utilizando a coluna CHIRALPAK AD-RH e fases móveis constituídas por etanol, metanol e ACN, acrescidas de DEA. Levando em consideração que o método seria desenvolvido empregando a espectrometria de massas para detecção e que pelos princípios dessa técnica os compostos ZO, N-OX e N-Des poderiam eluir no mesmo tempo de retenção, a otimização da separação foi feita buscando apenas a completa resolução dos enantiômeros de cada analito no menor tempo possível.

Durante a avaliação das várias fases móveis verificou-se que a presença de ACN reduz significativamente o tempo da corrida cromatográfica (menor tempo de análise), mas esta também diminui a resolução quiral dos metabólitos, principalmente da N-Ox. Além disso, o etanol é o principal solvente capaz de separar os enantiômeros, porém sua presença em grandes concentrações deixa a análise significativamente mais longa. O metanol sozinho não consegue separar completamente os enantiômeros, mas combinado ao etanol, auxilia diminuindo os tempos de retenção sem prejudicar a resolução dos enantiômeros. A DEA foi empregada em todas as fases móveis avaliadas, visando reduzir a interação dos solutos básicos analisados com os grupos silanóis residuais presentes no suporte empregado na preparação dessa fase estacionária. A fase móvel selecionada foi: etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) + 0,1% DEA.

Sabendo que a presença de DEA pode interferir na ionização dos analitos quando se emprega a espectrometria de massas com fonte ESI na detecção, realizou-se um estudo para verificar se a DEA poderia ser suprimida da fase móvel ou substituída por ácido acético. A fase móvel composta apenas de etanol: metanol: ACN (50:45:5, v/v/v) não foi eficaz na resolução dos enantiômeros do metabólito N-Ox **(Figura 3.6**). O ácido acético também se mostrou ineficaz, prejudicando a separação de todos os compostos. O próximo passo foi determinar a quantidade mínima necessária de DEA na fase móvel para a resolução eficiente dos enantiômeros de todos os analitos. A separação desejada foi obtida com a fase móvel etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) + 0,025% de DEA.



(A) (B)

Figura 3.6 Cromatogramas referentes à análise da N-Ox na concentração de 100 ug mL^{-1} na coluna CHIRALPAK AD-RH. Fase móvel: etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) sem DEA (A) e com 0,025% de DEA (B). Detecção em 305 nm, vazão de 1,0 mL min^{-1}.

Depois de otimizar a separação cromatográfica, a condição selecionada foi:

Coluna: CHIRALPAK AD-RH (150 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm)

Coluna guarda: CN LiChrospher (4 mm x 4 mm, partículas de 5 µm)

Fase móvel: etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) + 0,025% DEA (modo isocrático)

Vazão da fase móvel: 1,0 mL min^{-1}.

Volume de injeção: 20 µL

Entre as análises o injetor e a seringa foram lavados com etanol 100% para eliminar os resíduos dos analitos.

Na literatura, a separação da ZO e/ou seus metabólitos é descrita utilizando o modo normal e as colunas CHIRALCEL OD-H (FERNANDEZ 1991, 1993, 1995, 2002, FOSTER et al.,1994; GEBAUER; ALDERMAN, 2002) e CHIRALPAK AS (MANNAERT; DAENENS 1996). O tempo de análise desses métodos gira em torno de 30 a 60 minutos. Até o presente momento, a separação da ZO e seus metabólitos utilizando a coluna CHIRALPAK AD-RH ainda não foi relatada na literatura.

A ZO e seus metabólitos N-Ox e N-Des são substâncias polares; seus log P e pKa são 2,7 e 6,7; 1,2 e 4,9; 2,5 e 8,3 respectivamente, para ZO, N-Ox e N-Des (valores obtidos do programa de computador Scifinder scholar da ACD/Labs, Toronto, ON, Canadá, versão 2007). Depois de estabelecida a condição cromatográfica, substâncias com log P e pKa parecidos com o fármaco foram analisados nessa condição afim de se escolher um padrão interno adequado. Dentre os fármacos avaliados, a moclobemida foi selecionada.

Para melhorar a detecção por espectrometria de massas, decidiu-se utilizar a infusão pós-coluna de uma solução aquosa de acido acético. A adição desse ácido neutraliza a DEA presente na fase móvel, favorecendo a ionização dos analitos básicos. Neste caso, soluções aquosas de ácido acético em diferentes concentrações (0,2-2 %) e na vazão de 0,25 mL min^{-1} foram empregadas para verificar se a detectabilidade dos analitos aumentava. Foi observado que o uso da infusão pós-coluna de solução aquosa de ácido acético 1 %, na vazão de 0,25 mL min^{-1} melhorou a detecção em até 2,8 vezes, conforme mostrado na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1: Infusão pós-coluna

Área do pico Procedimento	**(-)-(R)-ZO**	**(+)-(S)-ZO**	**(-)-(R)-N-Des**	**(+)-(S)-N-Des**	**(-)-(R)-N-Ox**	**(+)-(S)-N-Ox**	**MO**
Sem infusão	1164	1087	251	262	590	553	67149
Infusão de solução aquosa de ácido acético 1%, na vazão de 0,25 mL min^{-1}	2855	2955	777	885	1516	1579	75853

A ordem de eluição dos enantiômeros dos analitos estudados foi estabelecida baseada no método descrito por Mannaert and Daenens (1996). A ordem de eluição obtida na coluna CHIRALPAK AD-RH foi (-)-(R)-ZO (9,2 min), (+)-(S)-ZO (13,1 min), (-)-(R)-N-Des (5,1 min), (+)-(S)-N-Des (7,1 min), (-)-(R)-N-Ox (4,4 min) e (+)-(S)-N-Ox (5,4). (**Figura 3.7**).

A resolução dos enantiômeros dos analitos estudados foi calculada através da equação descrita no item 3.3.2.1. A resolução obtida nas condições otimizadas para a coluna CHIRALPAK AD-RH foi Rs = 3,6, 1,7 e 3,7, respectivamente, para os enantiômeros do ZO, N-Ox e N-Des.

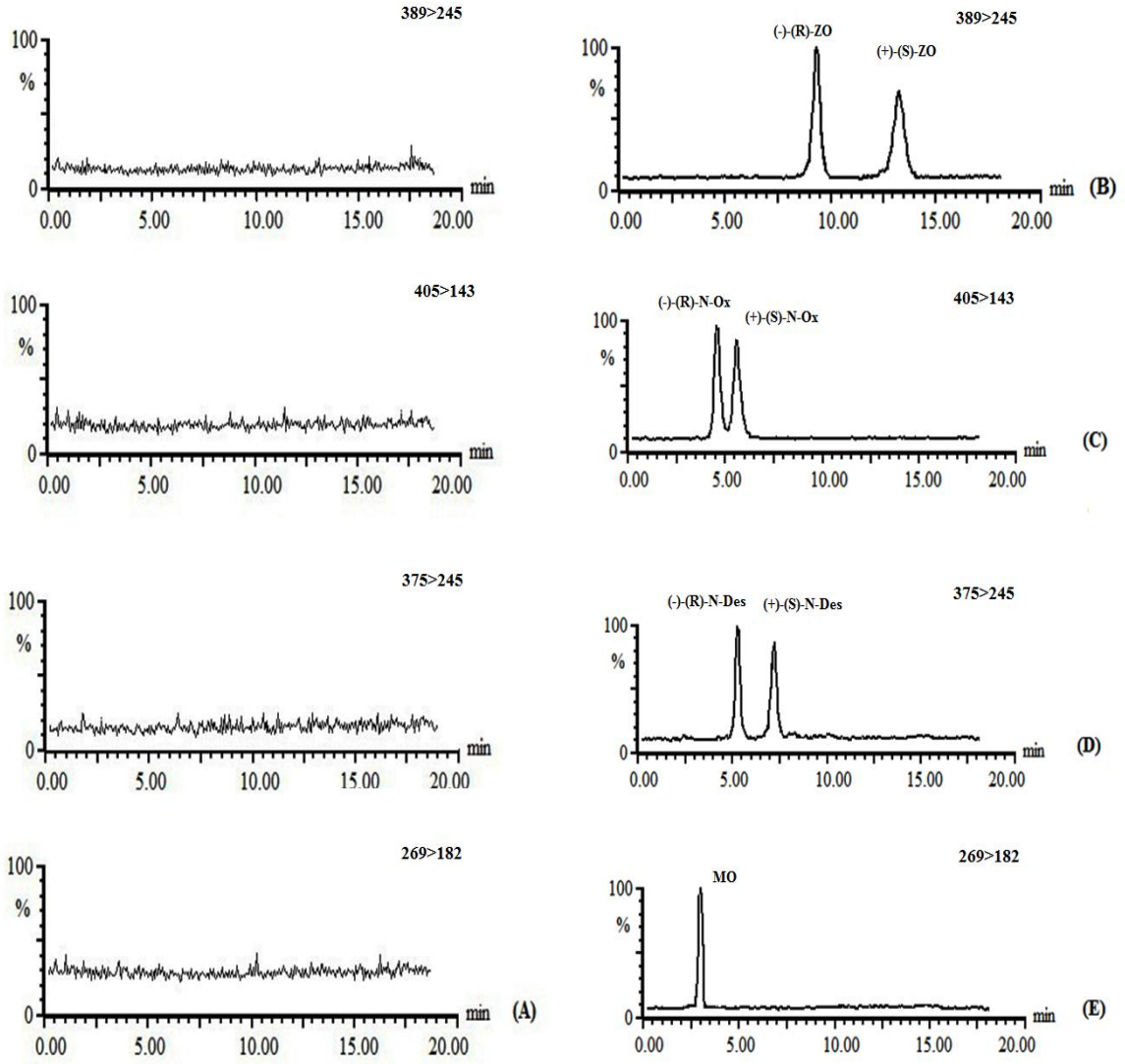


Figura 3.7. Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO e seus metabólitos em amostras de plasma de ratos. (A) brancos de plasma de rato, (B) ZO, (C) N-Des, (D) N-Ox na concentração de 50 ng mL^{-1} de cada enantiômero. (E) MO na concentração 1 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por etanol:metanol:ACN (50:45:5, v/v/v) + 0,025% DEA, vazão de 1,0 mL min^{-1}. Infusão pós-coluna de ácido acético 1 % (v/v) na vazão de 0,25 mL min^{-1}.

3.4.2 Procedimento de preparação das amostras

O próximo objetivo foi definir um solvente de extração capaz de extrair a ZO e seus metabólitos simultaneamente empregando a LLE. Para isso foram avaliados diferentes solventes como tolueno, diclorometano, acetato de etila, isopropanol e éter etílico, isolados e combinados entre si. Entre os solventes avaliados a maior recuperação de todos os analitos foi obtida com diclorometano:isopropanol (8:2, v/v).

De acordo com Fernandez et al. (1995), a ZO é instável em solventes nucleofílicos e a racemização ocorre principalmente em altas temperaturas e condições alcalinas. No entanto, os autores observaram que não houve degradação ou racemização em matrizes biológicas quando as amostras foram armazenadas a -20 ºC por até seis meses. Assim, para estudar a racemização durante o processo de extração da amostra, a estabilidade dos enantiômeros isolados da ZO e de seus metabólitos foi avaliada em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 6,0, pH 7,0 e pH 8,0. Degradação e racemização não foram observadas nos pHs estudados, além disso, os valores de recuperação foram próximos (**Tabela 3.2**). O tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 6,0 foi selecionado e assim, antes da extração, o pH da amostra de plasma foi ajustado para este valor.

Tabela 3.2. Influência do pH na extração dos enantiômeros da ZO e seus metabólitos.

Analito	Recuperação (%) pH 6,0	Recuperação (%) pH 7,0	Recuperação (%) pH 8,0
(-)-(R)- ZO	71,1	69,7	71,3
(+)-(S)-ZO	72,3	65,5	69,9
(-)-(R)- N-Des	61,7	53,8	49,8
(+)-(S)-N-Des	63,3	60,8	54,6
(-)-(R)- N-Ox	66,6	60,1	55,2
(+)-(S)-N-Ox	68,0	64,5	59,2

A **Figura 3.8** mostra o esquema do procedimento de extração otimizado.

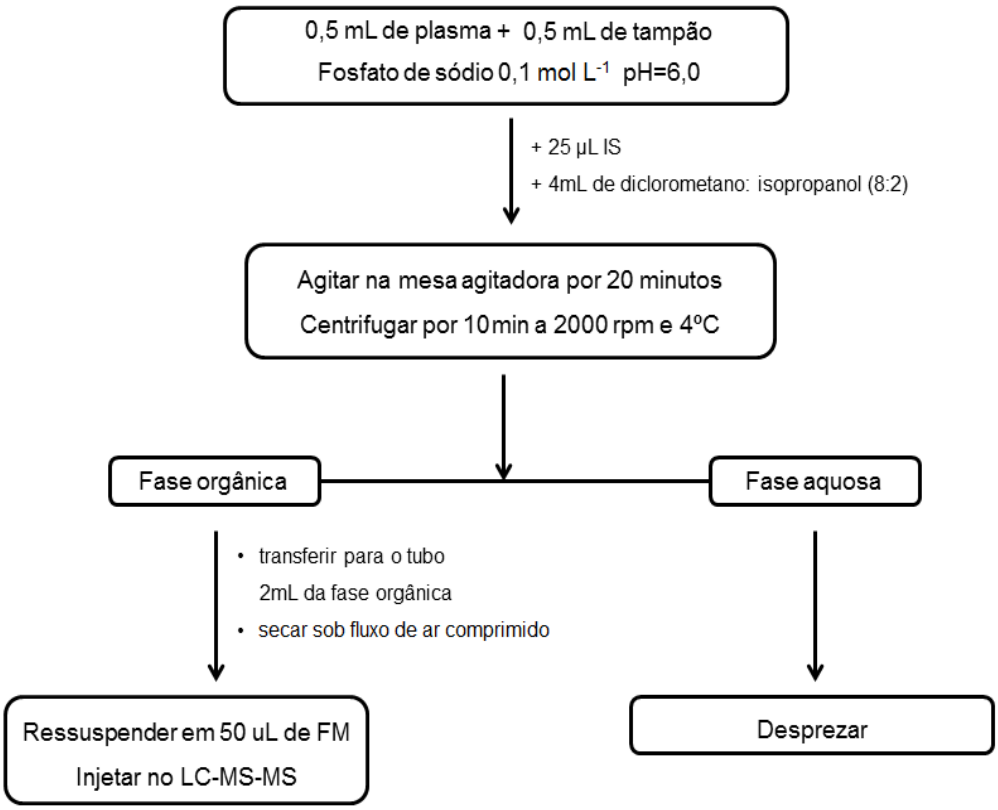


Figura 3.8 Fluxograma do procedimento de extração otimizado

3.4.3 Validação bioanalítica do método desenvolvido

Para o procedimento de validação do método bioanalítico e posterior aplicação em um estudo piloto de disposição cinética em ratos, foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, limite de quantificação, estabilidade, efeito da matriz na ionização dos analitos e robustez.

3.4.3.1 Seletividade

A seletividade de um método corresponde à sua capacidade em garantir que os resultados obtidos na quantificação do analito estudado não sofram interferência de qualquer possível metabólito, produto de degradação ou substância presente durante a análise do mesmo (CASSIANO et al., 2009; FDA, 2001; ANVISA, 2003). A seletividade do método foi avaliada através da análise de amostras de plasma livre do fármaco, padrão interno e metabólitos. A **Figura 3.7** mostra a análise do plasma evidenciando a ausência de picos interferentes co-eluindo com os analitos.

Na análise por MS, todos os analitos são ionizados e os íons são analisados de acordo com sua relação m/z. No modo SRM, as moléculas protonadas $[M + H]^+$ são selecionadas no primeiro quadrupolo, fragmentadas no segundo quadrupolo e um fragmento com m/z específico é selecionado no terceiro quadrupolo. Então, a resolução entre fármacos e metabólitos não é necessária porque eles são detectados simultaneamente em diferentes combinações de moléculas protonadas/fragmento. Entretanto, a separação dos enantiômeros é necessária, pois ambos serão monitorados com a mesma transição de m/z.

3.4.3.2 Efeito da matriz na ionização dos analitos

A detecção por espectrometria de massas no modo SRM é bastante seletiva e, dessa forma, compostos da matriz que coeluem com o analito não interferem na análise. Por outro lado, esses componentes da matriz podem interferir na ionização adequada dos analitos, aumentando ou diminuindo a resposta do detector e levando a uma variabilidade da resposta em função da composição da matriz. (FDA, 2001; ANVISA, 2003; CASSIANO et al. 2009).

Para avaliar o efeito da matriz na ionização dos analitos, as áreas dos picos dos enantiômeros do ZO, N-Des e N-Ox de soluções-padrão foram comparadas com as áreas dos picos desses analitos fortificados no extrato obtido pela extração de plasma branco de ratos. As diferenças de áreas obtidas foram inferiores a 15% para todos os analitos nas concentrações estudadas, o que indica que componentes endógenos do plasma não afetam significativamente a ionização dos analitos (**Tabela 3.3**).

Tabela 3.3 Efeito da matriz na análise de ZO, N-Ox, N-Des e MO em plasma de ratos.
.

Analitos	**(-)-(R)- ZO**		**(+)-(S)-ZO**		**(-)-(R)-N-Des**		**(+)-(S)-N-Des**		**(-)-(R)- N-Ox**		**(+)-(S)-N-Ox**		**MO (IS)**	
Conc. ng mL^{-1}	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)
1000													-4,1	3,0
7,5	-4,9	3,6	2,8	2,0	10,4	7,0	8,8	6,0	8,7	5,9	-11,7	8,8		
20	-4,3	3,1	-0,2	0,1	12,7	8,5	5,4	3,7	7,4	5,0	-9,5	7,2		
400	-4,1	2,9	-2,5	1,8	12,1	8,1	13,4	8,9	4,9	3,4	-10,8	8,1		

3.4.3.3 Linearidade

Para avaliação da linearidade emprega-se uma curva analítica, através da qual se verifica se existe relação linear entre a concentração do analito na amostra e a resposta do equipamento. Para o tratamento dos dados obtidos empregou-se uma ponderação de $1/x^2$. Os critérios de aceitação incluem a obtenção de coeficiente de correlação linear maior que 0,98 para todos os analitos. Os dados apresentados na **Tabela 3.4** confirmam linearidade satisfatória para todos os analitos estudados na faixa de concentração de 7,5- 500 ng mL^{-1} . A análise de variância dos dados comprovou a significância das equações de regressão, não havendo falta de ajuste do modelo linear (p < 0,05) confirmando que o método proposto foi considerado linear (PIMENTEL; BARROS NETO, 1995).

Tabela 3.4. Linearidade do método.

Analitos	Linearidade			ANOVA	
	Intervalo (ng mL^{-1})	Equação da reta	Coeficiente de correlação	Valor de (*F*)	Valor de ($F_{critico}$)
(-)-(R)-ZO	7,5 -500	y = 0,00859081x + 0,00293963	0,996637	182	1,99
(+)-(S)-ZO	7,5 -500	y = 0,00833337x + 0,0118819	0,993833	208	1,99
(-)-(R)-N-Des	7,5 -500	y = 0,00601008x + 0,0077781	0,994782	118	1,99
(+)-(S)-N-Des	7,5 -500	y = 0,00552396x + 0,0181615	0,993633	152	1,99
(-)-(R)-N-Ox	7,5 -500	y = 0,00731844x - 0,0102016	0,993401	133	1,99
(+)-(S)-N-Ox	7,5 -500	y = 0,00761616x - 0,0143109	0,996404	206	1,99

3.4.3.4 Recuperação

As recuperações foram obtidas utilizando amostras fortificadas nas concentrações de 20, 200 e 400 ng mL^{-1} de cada enantiômero, de cada analito, em triplicata. Essas amostras foram extraídas e analisadas e os resultados obtidos foram comparados com os valores obtidos referentes à injeção de soluções-padrão, nas mesmas concentrações, não submetidas ao processo de extração. A recuperação manteve-se entre 57 e 75 %, com desvios padrão relativos não superiores a 15 %, conforme apresentado na **Tabela 3.5**.

Trabalhos descritos na literatura mostram que a recuperação da ZO utilizando a LLE apresenta valores de 63 % a 90 % (FOSTER et al.,1994; GEBAUER; ALDERMAN, 2002; FERNANDEZ et al., 1991, NIROGI; KANDIKERE; MUDIGONDA, 2006). Assim, a recuperação obtida no método desenvolvido está dentro da faixa reportada na literatura. Além disso, valores apresentados em torno de 90% de recuperação correspondem aos métodos desenvolvidos apenas para o fármaco. A extração da ZO e seus metabólitos é descrita por Nirogi, Kandikere e Mudigonda (2006) com recuperações de 63 % e por Gebauer e Alderman (2002) com valores em torno de 72 %.

Tabela 3.5. Recuperação do método.

Analitos	Concentração (ng mL^{-1}, *n* = 3)[a]	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
(-)-(R)-ZO	20	69,2	5,2	74,6	14,6
	200	87,1	5,4		
	400	67,4	6,3		
(+)-(S)-ZO	20	76,5	8,3	75,7	4,8
	200	78,9	6,9		
	400	71,7	9,7		
(-)-(R)-N-Des	20	70,1	11,4	61,6	15,0
	200	63,0	4,6		
	400	51,8	5,4		
(+)-(S)-N-Des	20	67,1	11,5	57,0	15,0
	200	52,1	4,8		
	400	51,7	6,9		
(-)-(R)-N-Ox	20	78,8	4,7	72,5	10,8
	200	75,1	8,1		
	400	63,7	1,6		
(+)-(S)-N-Ox	20	77,3	4,4	70,7	10,6
	200	72,4	3,7		
	400	62,6	2,3		

[a] Número de determinações.

3.4.3.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão demonstram o desvio e erro de uma medida analítica, sendo a precisão o parâmetro que demonstra o quão próximos estão os resultados obtidos de amostras independentes. A exatidão demonstra a concordância do resultado obtido com o método e o valor real (CASSIANO et al., 2009). Para determinação da precisão e exatidão interensaios, foram avaliados três níveis de concentração durante três dias consecutivos. A precisão e exatidão intraensaio foi avaliada através de cinco determinações em cada nível de concentração (20, 200 e 400 ng mL $^{-1}$). Os valores obtidos apresentados na **Tabela 3.6** estão em acordo com os guias de validação para métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003; FDA, 2001), mantendo-se abaixo de 15 %.

Tabela 3.6. Precisão e exatidão do método.

Analitos	Intraensaio (n = 5)[a]			Interensaios (n = 3)[b]		
	Concentração (ng mL^{-1})	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL^{-1})	CV (%)	E (%)
(-)-(R)- ZO						
20 ng mL^{-1}	19,5	2,1	-2,7	19,1	10,6	-4,6
200 ng mL^{-1}	203,4	1,7	1,7	207,4	2,9	3,7
400 ng mL^{-1}	409,5	2,7	2,4	407,5	2,1	1,9
(+)-(S)-ZO						
20 ng mL^{-1}	19,9	5,5	-0,4	19,7	8,4	-1,6
200 ng mL^{-1}	207,4	1,0	3,7	205,6	2,3	2,8
400 ng mL^{-1}	403,4	2,9	0,8	403,9	2,0	1,0
(-)-(R)-N-Des						
20 ng mL^{-1}	20,1	6,1	0,3	20,0	7,8	0,0
200 ng mL^{-1}	209,9	3,1	4,9	208,4	4,8	4,2
400 ng mL^{-1}	405,5	1,4	1,4	402,7	1,7	0,7
(+)-(S)-N-Des						
20 ng mL^{-1}	18,9	8,6	-5,3	19,3	14,2	-3,7
200 ng mL^{-1}	209,5	2,2	4,7	213,6	15,0	6,8
400 ng mL^{-1}	415,4	0,8	3,8	405,2	2,0	1,3
(-)-(R)-N-Ox						
20 ng mL^{-1}	20,0	3,6	0,0	20,3	5,5	1,6
200 ng mL^{-1}	211,8	3,2	5,9	219,5	7,3	9,7
400 ng mL^{-1}	405,2	1,7	1,3	406,6	1,3	1,7
(+)-(S)-N-Ox						
20 ng mL^{-1}	19,3	5,9	-3,7	20,1	6,3	0,5
200 ng mL^{-1}	204,9	1,7	2,4	211,2	6,7	5,6
400 ng mL^{-1}	403,4	1,6	0,8	412,2	13,0	3,1

a Número de amostras
b Número de dias

3.4.3.6 Limite de quantificação

Nas condições descritas, foi obtido um limite de quantificação (LOQ) de 7,5 ng mL^{-1} conforme apresentado na **Tabela 3.7.** Os valores de coeficiente de variação e erro relativo foram inferiores a 20 %. Comparando o método desenvolvido com os outros relatados na literatura, pode-se observar semelhanças no limite de quantificação. No entanto, este método apresenta as vantagens de uma maior seletividade, devido ao uso do MS-MS para detecção, menor tempo de análise e simplicidade, devido à utilização de apenas uma coluna.

Tabela 3.7. Limite de quantificação do método

Analitos	**(-)-(R)- ZO**	**(+)-(S)-ZO**	**(-)-(R)- N-Des**	**(+)-(S)-N-Des**	**(-)-(R)-N-Ox**	**(+)-(S)-N-Ox**
LOQ (ng mL^{-1})	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
E (%)	2,4	1,9	3,2	4,8	2,7	-9,3
CV (%)	2,0	3,8	2,0	3,0	2,2	9,4

3.4.3.8 Estabilidade

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade estão apresentados na **Tabela 3.8**. Estes resultados mostram que ZO e seus metabólitos são estáveis no plasma de ratos durante o período deste estudo, em outras palavras, nenhuma degradação foi observada nas condições descritas de armazenamento e de análise.

Tabela 3.8 Estabilidade do método.

Analitos	Estabilidade Bancada (*n* = 3)		Congelamento e descongelamento (*n* = 3)		Longa Duração (*n* = 3)	
	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)
(-)-(R)- ZO						
20 ng mL^{-1}	7,1	3,6	1,1	5,8	11,5	-12,4
400 ng mL^{-1}	1,3	-0,8	1,5	-0,3	9,6	-7,3
(+)-(S)-ZO						
20 ng mL^{-1}	11,2	1,2	7,0	8,2	2,1	-11,6
400 ng mL^{-1}	1,0	0,2	3,0	-2,8	13,7	4,5
(-)-(R)-N-Des						
20 ng mL^{-1}	8,5	-0,8	5,9	11,4	6,7	1,1
400 ng mL^{-1}	0,5	0,8	1,9	1,8	7,0	-9,7
(+)-(S)-N-Des						
20 ng mL^{-1}	4,7	-5,8	10,2	0,2	4,1	4,4
400 ng mL^{-1}	0,8	-4,4	1,3	1,8	7,5	-12,8
(-)-(R)-N-Ox						
20 ng mL^{-1}	8,4	10,5	8,6	-1,0	4,1	4,4
400 ng mL^{-1}	0,6	4,7	1,1	-0,5	7,6	-11,8
(+)-(S)-N-Ox						
20 ng mL^{-1}	2,8	8,3	8,5	5,7	4,4	5,8
400 ng mL^{-1}	2,2	0,7	1,6	-2,6	11,4	5,9

A estabilidade das soluções-padrão de ZO, N-Ox e N-Des em ACN, armazenadas a temperatura de -20 °C e protegidas da ação da luz foram avaliadas durante o período da validação e aplicação do método analítico. Os resultados obtidos encontram-se dentro dos limites especificados. Os desvios observados em relação às áreas obtidas no dia do preparo das soluções-padrão foram de 8,2% para o ZO, 6,0% para o N-Ox e 4,6% para o N-Des.

3.4.3.8 Robustez

Os resultados obtidos na avaliação da robustez do método foram tratados pelo software Minitab. Os fatores, avaliados pelo gráfico de Pareto, foram a porcentagem de metanol na fase móvel, a porcentagem de DEA na fase móvel, a temperatura da fonte e a vazão da fase móvel. Esses fatores correspondem, respectivamente, aos códigos A, B, C e D. A combinação de dois códigos indica o efeito da interação entre essas duas variáveis. O tamanho de cada efeito foi representado por barras. O valor t-crítico para α de 0,05 foi representado por uma linha vertical. Os efeitos para os quais as barras são menores que o valor de t-crítico são considerados como efeitos não significativos, ou seja, são efeitos para os quais pequenas variações não afetam a resposta do método. Portanto, todos os resultados (**Figura 3.9**) mostram que os fatores avaliados não foram estatisticamente significantes para interferir no resultado, comprovando assim a robustez do método.

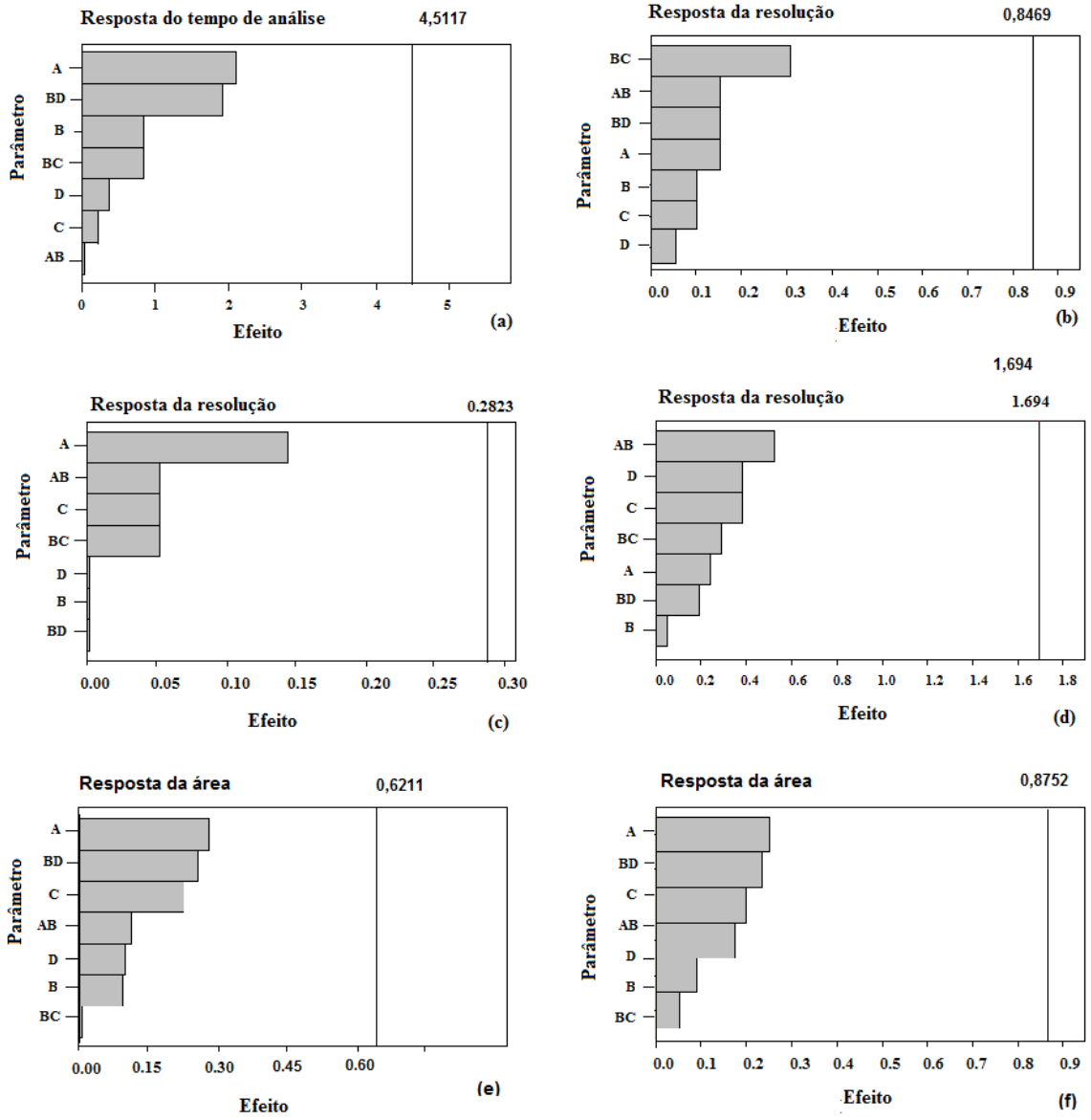


Figura 3.9. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações no tempo de análise da ZO (a), na resolução dos enantiômeros da ZO (b), na resolução dos enantiômeros da N-Ox (c), na resolução dos enantiômeros do N-Des (d), na área do (-)-(R)-ZO (e) e na área do (+)-(S)- ZO (f). A linha vertical representa o valor de t-crítico.

3.4.4 Aplicação do método

O método validado foi utilizado para determinar as concentrações plasmáticas dos enantiômeros da ZO e de seus metabólitos em um grupo de ratos Wistar machos, jovens e saudáveis, após receber uma dose de 3 mg de ZO por kg de peso corporal. A **Figura 3.10** mostra as concentrações plasmáticas obtidas nos respectivos tempos de coleta, após administração da ZO. A concentração plasmática de ambos os enantiômeros e seus metabólitos puderam ser determinadas até 8 h após a administração de uma dose única de ZO. Pode-se observar que os níveis de (+)-(S)-ZO foram superiores aos de (-)-(R)-ZO. Os mesmos resultados foram observados para (+)-(S)-N-Ox e (+)-(S)-N-Des. Além disso, esses resultados concordam com estudos anteriores sobre a disposição cinética estereosseletiva da ZO em ratos (FERNANDEZ et al., 2002) e voluntários sadios (FERNANDEZ et al., 1991, 1993, FOSTER et al., 1994)

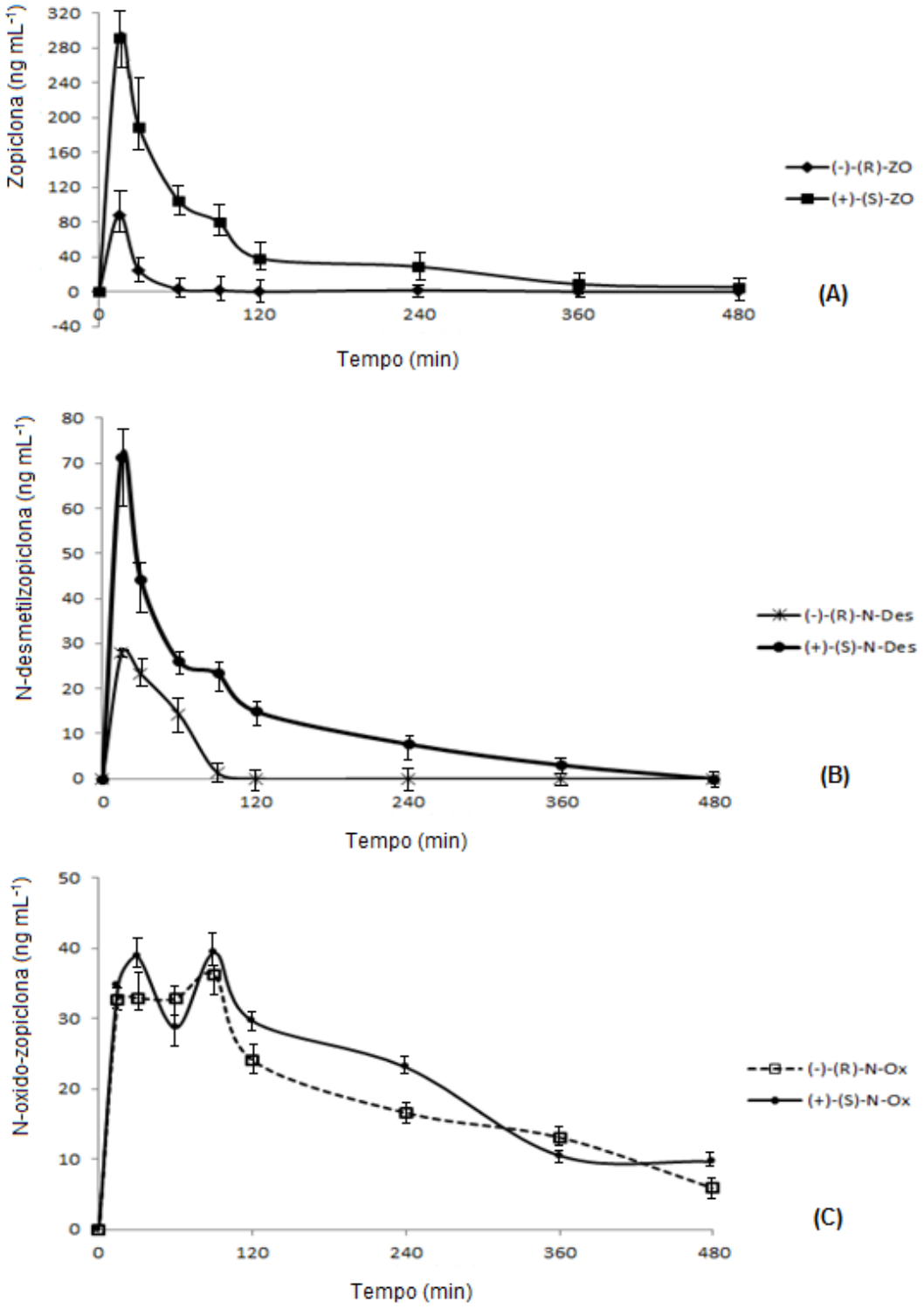


Figura 3.10. Gráfico da concentração plasmática de (A) ZO, (B) N-Ox e (C) N-Des *versus* tempo de coleta, referente à análise das amostras de plasma de ratos após dose oral única de ZO. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n=6).

Análise enantiosseletiva da ZO em cérebro de ratos

4. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA ZO EM CÉREBRO DE RATOS

4.1 INTRODUÇÃO

Os fármacos psicotrópicos são substâncias que atuam no cérebro (ou sistema nervoso central). Os fármacos depressores agem deprimindo a atividade cerebral e, assim, o cérebro funciona em ritmo mais lento. Os fármacos depressores mais conhecidos são os utilizados em medicamentos para ansiedade, nos indutores de sono como a ZO, entre outros.

A concentração de um fármaco no sangue após a administração oral é diferente da concentração encontrada no cérebro, já que a barreira hematoencefálica é uma importante fronteira entre o sistema nervoso central e todo o restante do organismo. Além disso, as enzimas microssomais são expressas em vários outros tecidos, incluindo o cérebro, além do fígado que é o principal órgão metabolizador de fármacos (BLOOM, 2004; ZHANG et al., 2012). O transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica e o metabolismo no cérebro podem ser estereosseletivos e, portanto, a concentração dos enantiômeros do fármaco e metabólitos ativos também pode diferir entre as duas matrizes (TRIGGLE, 1997).

Portanto, a determinação de fármacos e metabólitos em tecido cerebral, principalmente de forma estereosseletiva, pode trazer importantes informações a respeito do mecanismo de ação de fármacos que atuam no sistema nervoso central (TRIGGLE, 1997, ZHANG et al., 2012).

Sendo assim, um método para análise da ZO em cérebro de ratos foi desenvolvido para poder comparar as concentrações plasmáticas obtidas no estudo descrito no Capítulo 3 e as concentrações encontradas no cérebro.

O único método descrito na literatura que reporta a análise de ZO em cérebro de ratos foi publicado por Fernandez et al. (2002). Nesse método, a extração da ZO da matriz foi feita por LLE utilizando cloreto de metileno:isopentano:isopropanol (50:47,5:2,5, v,v,v). A recuperação obtida no método foi de 75,4% e 73,3% para cada enantiômero da ZO.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver e validar um método de análise enantiosseletiva para quantificação da ZO em cérebro de ratos empregando LC-MS-MS, com aplicação em um estudo piloto de disposição cinética.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Materiais

4.3.1.1 Reagentes e solventes

Os analitos ZO e MO (utilizada como padrão interno, IS), os solventes acetonitrila, etanol, metanol, isopropanol e diclorometano, os reagentes fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico, o aditivo DEA e água foram obtidos conforme descrito no Capítulo 3, itens 3.3.1.1. O acetato de amônio foi comprado da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.3.1.2 Soluções-padrão

Uma solução-padrão de ZO foi preparada na concentração de 100 µg mL^{-1} em ACN e, a partir dessa solução, foram preparados os padrões de calibração por diluição apropriada em ACN, na faixa de concentração de 0,01– 12 µg mL^{-1} para cada enantiômero. Para construção das curvas analíticas, amostras de 1 mL de homogeneizado de cérebro em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 6 (obtido de acordo com o item 4.3.2.3 desse capítulo) foram fortificadas com 50 uL das

soluções-padrão de ZO e 50 uL do IS (solução de MO, preparada em metanol na concentração de 1 µg mL^{-1}). As concentrações finais para estas amostras foram de 0,29, 5,75, 28,4, 57,5, 86,2, 172,4, 229,9 e 344,8 ng de cada enantiômero por grama de cérebro. As amostras-controle (QC) utilizadas na validação do método foram preparadas nas concentrações de 0,29, 57,5,e 229,9 ng g^{-1} de cada enantiômero.

4.3.1.3 Animais

A espécie, a procedência e o tratamento dado aos ratos foram descritos no Capítulo 3, item 3.3.1.3.

4.3.1.4 Equipamentos e acessórios

O sistema cromatográfico (LC-MS-MS) e demais equipamentos utilizados foram descritos no Capítulo 3, item 3.3.1.4. A preparação das amostras foi feita por extração em fase sólida empregando o sistema de extração Supelco Visiprep (Bellefonte, PA, EUA). O procedimento de extração foi feito empregando cartuchos recheados com sorventes preparados pela ligação de grupos octadecil (6 mL, 500 mg, partículas de 40 µm) e octil (6 mL, 500 mg, partículas de 40 µm) a um suporte de sílica (J T Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).

A homogeneização do cérebro foi efetuada utilizando um homogeneizador de tecidos Omni (Omni TH International, Marietta, GA, EUA).

4.3.1.5 Colunas cromatográficas quirais e coluna de guarda

Apesar da separação da ZO já ter sido descrita no Capítulo 3, uma nova avaliação da separação foi conduzida, com o objetivo de reduzir o tempo de análise. Para tanto, a coluna CHIRALCEL OD-R foI avaliada no modo reverso e polar-orgânico e as colunas CHIRALPAK AD e CHIRALPAK AD-RH no modo polar orgânico:

- Coluna CHIRALPAK AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.
- Coluna CHIRALPAK AD-RH (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.
- Coluna CHIRALCEL OD-R (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída de derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

Na análise de amostras biológicas, a proteção da coluna analítica foi feita empregando uma coluna de guarda Lichrospher CN de 4 x 4 mm e partículas de 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Separação cromatográfica

As condições empregadas na avaliação dessas colunas foram idênticas ao descrito no Capítulo 3, item 3.3.2.1. Entre as análises o injetor e a seringa foram lavados com etanol 100% para eliminar os resíduos dos analitos.

A detecção foi feita por espectrometria de massas usando o modo SRM. A tensão do cone foi definida em 20 V para a ZO e 23 V para o IS. A energia de colisão foi de 20 eV para a ZO e 15 eV para o IS. As transições monitoradas foram m/z 389>245 para ZO e m/z 269>182 para o IS.

4.3.2.2 Ordem de eluição

Depois de estabelecidas as condições de separação da ZO, a ordem de eluição dos enantiômeros da ZO foi determinada conforme descrito no Capítulo 3, item 3.3.2.3.

4.3.2.3 Procedimento de preparação das amostras

Os cérebros de ratos controle ou tratados com ZO foram removidos dos animais após decapitação. Depois de pesados, os cérebros (1,74 g) foram homogeneizados com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 6,0 utilizando um homogeneizador de tecidos. Alíquotas de 1,0 mL desse homogeneizado foram fortificadas com 50 uL da solução-padrão de ZO e 50 uL da solução de MO (ratos controle) ou só com o IS (ratos tratados) e diluídas com 1 mL de tampão fosfato de

sódio. Os tubos foram centrifugados a 2000 × g por 10 min a 15 ºC. Uma fração de 1 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de vidro e mais 1 mL de tampão fosfato de sódio foi adicionado. Após agitação no vórtex, a ZO e IS foram extraídos por SPE. Para desenvolvimento do método de extração avaliou-se a influência da diluição da amostra, do tipo de sorvente (C8 ou C18), da condição de ativação do cartucho (água, metanol, tampão, ácido fórmico), da condição de lavagem (água, tampão, ACN, ACN 5% em água, ácido fórmico 0,1% em água) e do solvente de extração (ACN, metanol e diclorometano:isopropanol (8:2, v/v)).

4.3.2.4 Validação do método

Após definição de todos os parâmetros do método, procedeu-se a validação bioanalítica, avaliando os principais parâmetros, semelhantes ao descrito no Capítulo 3, item 3.3.2.5.

A curva de calibração foi preparada nas concentrações de 0,29, 5,75, 28,4, 57,5, 86,2, 172,4, 229,9 e 344,8 ng de cada enantiômero de ZO por grama de cérebro. O efeito da matriz na ionização dos analitos foi avaliado nas concentrações de 0,29, 57,5 e 229,9 ng g^{-1}. Foi avaliado também o efeito da matriz na ionização do IS, na concentração utilizada na validação (1 µg mL^{-1}). O LOQ foi determinado avaliando amostras de cérebro de ratos fortificadas com 0,29 ng g^{-1} de cada enantiômero da ZO. A recuperação, a exatidão e a precisão foram avaliadas pela análise de amostras de cérebro de ratos fortificadas com 0,29, 57,5 e 229,9 ng g^{-1} de cada enantiômero de ZO. A estabilidade da ZO foi avaliada nas concentrações de 0,29 e 229,9 ng g^{-1} de cada enantiômero da ZO. No estudo da robustez do método, os fatores avaliados foram a porcentagem de etanol na fase móvel (15 e 25 %), procedência da acetonitrila (Tedia, Fairfield, OH, EUA e Merck, Darmstadt, Alemanha) e vazão da fase móvel (1,2 mL min^{-1} e 1,4 mL min^{-1}). A influência desses fatores foi avaliada usando um procedimento experimental de 2 níveis 2^3 (8 experimentos). As respostas foram avaliadas conforme descrito no capítulo 3, item 3.3.2.5.

4.3.2.5 Aplicação do método

O método validado foi empregado em um estudo piloto de disposição cinética em ratos seguindo os parâmetros e normas descritos no Capítulo 3, item 3.3.2.6. A coleta dos cérebros dos animais foi efetuada nos mesmos tempos em que as amostras de sangue foram coletadas. Os cérebros coletados foram imediatamente congelados e armazenados a -20ºC até o momento da análise.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Separação quiral

Na etapa de aplicação do método de análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos em plasma de ratos (Capítulo 3), fez-se um estudo piloto para investigar a presença da ZO, N-Des e N-Ox no cérebro desses animais. Nesse estudo verificou-se que era possível detectar apenas a ZO nos cérebros analisados uma vez que os metabólitos, por possuirem maior polaridade, não conseguem atravessar a membrana hematoencefálica. Sendo assim, optou-se por desenvolver um método para análise apenas da ZO no cérebro de ratos. Com o prévio conhecimento das fases estacionárias e fases móveis capazes de separar os enantiômeros da ZO adquirido durante o desenvolvimento do método relatado no Capítulo 3, buscou-se então estabelecer uma condição que permitisse a análise de ZO de forma simples, rápida e eficaz. Além da coluna CHIRALPAK AD que já havia sido empregada anteriormente, outras colunas (CHIRALCEL OD-R e CHIRALPAK AD-RH) também foram avaliadas.

Utilizando a coluna CHIRALCEL OD-R nos modos polar orgânico (fases móveis constituídas por etanol, ACN, metanol ou misturas desses solventes) ou reverso (fases móveis constituídas por misturas de ACN, etanol, água e acetato de amônio em água), não foi possível obter a separação adequada dos enantiômeros da ZO (**Figura 4.1**).

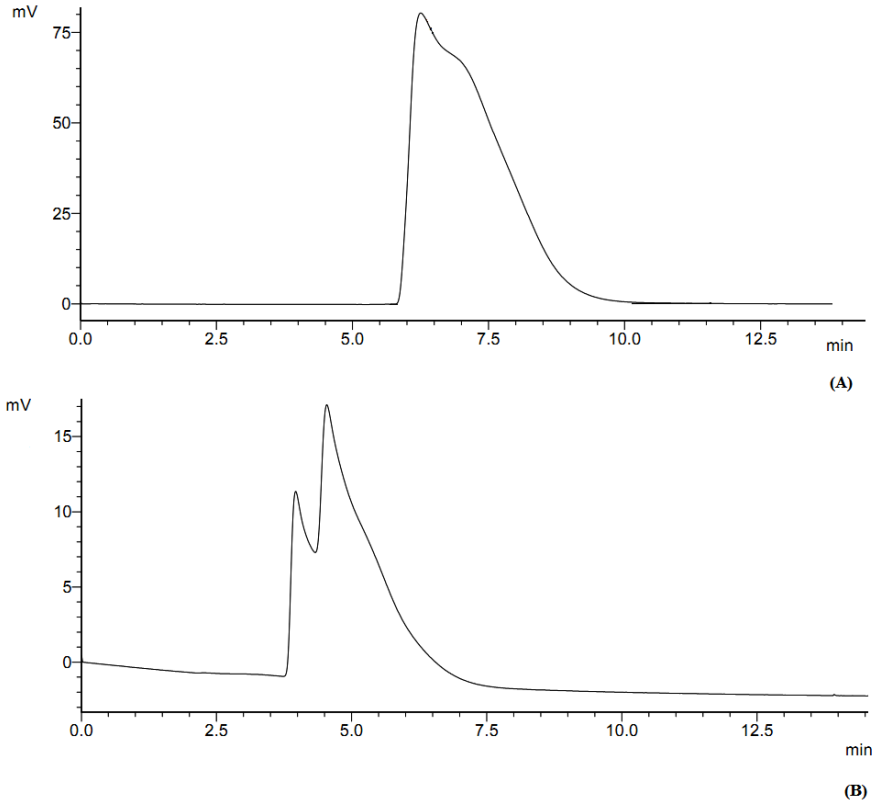


Figura 4.1 Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO na concentração de 100 ug mL^{-1}. Coluna CHIRACEL OD-R, fase móvel (A) etanol:água (50:50, v/v) e (B) etanol:metanol:ACN (20:60:20, v/v/v). Vazão de 1,0 mL e detecção em 305 nm.

As colunas CHIRALPAK AD-RH e CHIRALPAK AD foram adequadas para a resolução dos enantiômeros da ZO em condições de fase polar orgânica. No estudo anterior descrito no Capítulo 3, verificou-se que a ACN era capaz de diminuir o tempo de análise, porém interferia significativamente na resolução do metabólito N-Ox. Como agora o objetivo é separar apenas os enantiômeros da ZO, foi possível aumentar a porcentagem de ACN na composição da fase móvel, diminuindo o tempo de análise. Como a resolução dos enantiômeros da ZO foi maior na coluna CHIRALPAK AD (Rs = 3,1) se comparada a coluna CHIRALPAK AD-RH (Rs = 2,7)

utilizando a mesma composição de fase móvel (**Figura 4.2** - (A) e (B)), a coluna CHIRALPAK AD foi selecionada. Aumentos graduais de ACN foram testados a fim de determinar a melhor composição de fase móvel. O emprego da fase móvel ACN: etanol:metanol (60:20:20, v/v/v) resultou em uma redução significativa do tempo de análise (5 min) sem prejudicar a separação (**Figura 4.2** -(C)- (D)). ‘

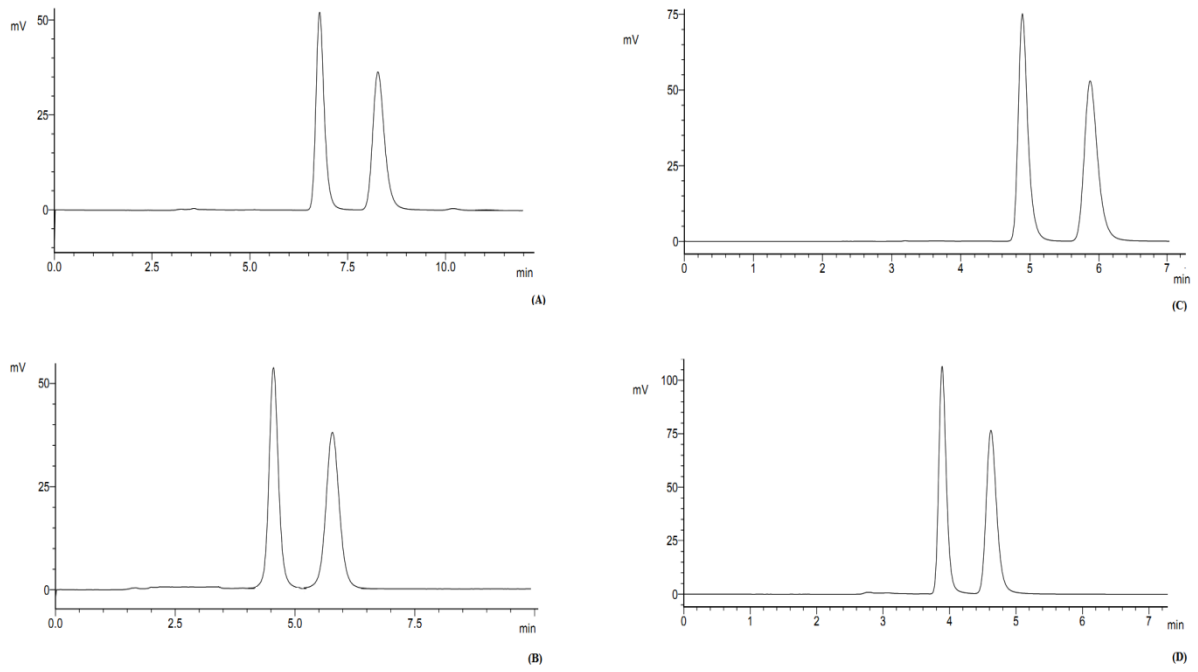


Figura 4.2 Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO na concentração de 100 ug mL^{-1}. Fase móvel constituída por etanol:metanol:ACN (20:60:20, v/v/v) nas colunas (A) CHIRALPAK AD e (B) CHIRALPAK AD-RH. Coluna CHIRALPAK AD empregada com as fases móveis (C) etanol:metanol:ACN (20:40:40, v/v/v) e (D) etanol:metanol:ACN (20:30:50, v/v/v). Vazão: 1,0 mL e detecção em 305 nm.

A ordem de eluição dos enantiômeros da ZO foi estabelecida pela análise dos enantiômeros isolados, conforme descrito no capítulo 3, item 3.3.2.3. A ordem de eluição obtida na coluna CHIRALPAK AD foi (-)-(R)-ZO (3,7 min), (+)-(S)-ZO (4,4 min) (**Figura 4.3**). Nessas condições, a MO eluiu com tempo de retenção de 3,3 min.

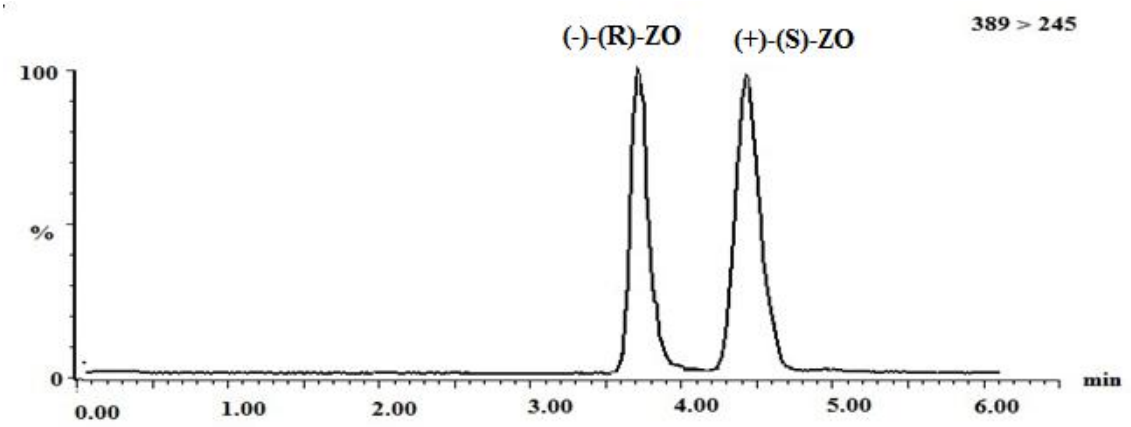


Figura 4.3. Cromatograma de ZO na coluna CHIRALPAK AD empregando a fase móvel constituída por ACN: etanol:metanol (60:20:20, v/v/v) na vazão de 1,3 mL min^{-1}.

Essa fase móvel sem DEA é bastante compatível com a detecção por espectrometria de massas. Portanto, não foi necessário utilizar a infusão pós-coluna de um solvente apropriado, como foi feito no método descrito no Capítulo 3.

4.4.2 Procedimento de extração

Embora a LLE tenha sido bastante eficiente na extração da ZO e seus metabólitos de amostras de plasma (Capítulo 3), decidiu-se desenvolver esse novo método empregando a SPE para a preparação das amostras. A SPE é baseada na distribuição do analito entre uma fase líquida que corresponde ao solvente de extração e uma fase sólida (cartucho contendo o sorvente extrator). Encontram-se disponíveis no mercado diferentes materiais de recheio para o emprego da técnica SPE. Esses recheios são muitas vezes similares aos usados como fase estacionária em HPLC, mas com partículas de maior diâmetro (40 µm).

As etapas do processo de extração foram definidas em função de testes preliminares, avaliando quanto do analito estava sendo recuperado e se o procedimento era eficaz para a remoção de interferentes da matriz. Um detalhe importante do procedimento de extração foi a necessidade de diluir o homogeneizado de cérebro com 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 6,0 (item 4.3.2.3), já que a viscosidade da amostra original impedia a eluição pelo cartucho e provocava o entupimento dos poros do recheio. Para a escolha do melhor sorvente extrator foram avaliados os cartuchos disponíveis no laboratório. A recuperação na extração da ZO foi maior utilizando o cartucho C18 (500 mg, 6 mL).

Além disso, foram avaliadas diversas modificações em todas as etapas da SPE para definir as condições que resultavam em melhor recuperação. Os métodos descritos na literatura para a extração de ZO e /ou seus metabólitos por SPE relatam que o condicionamento do cartucho foi feito com metanol, água e ácido bórico 5 mmol L^{-1}, pH 8,5 (NORDGREN; BODIN; BECK, 2002) e com metanol e ácido fórmico 0,05 % em água (MISTRI et al., 2008). Na etapa de otimização, além das condições descritas na literatura, foram avaliadas também as seguintes combinações: (a) metanol e água, (b) metanol, água e tampão fosfato de sódio, 0,1 mol L-1, pH 6. A combinação (a) foi selecionada para condicionamento do cartucho.

A lavagem do cartucho depois que a amostra é adicionada tem por finalidade retirar os interferentes da matriz. A água ou tampão fosfato de sódio, 0,1 mol L^{-1}, pH 6 não foram eficazes na remoção dos interferentes da matriz. Assim, foi necessário utilizar a mistura ACN:água (5:95, v/v)) depois da lavagem com o tampão fosfato de sódio para garantir a melhor remoção dos interferentes da matriz, sem que ocorresse a eliminação conjunta do fármaco.

A eluição da ZO dos cartuchos foi inicialmente avaliada com ACN. Os resultados mostrados no Capítulo 3 indicaram que a mistura diclorometano-isopropanol (80:20, v/v) foi eficiente para a extração da ZO e seus metabólitos de amostras de plasma. Portanto, esse solvente também foi avaliado na etapa de eluição do fármaco. A recuperação foi maior usando o diclorometano-isopropanol (80:20, v/v) e, portanto, esse solvente foi selecionado. Nos trabalhos descritos na literatura, a eluição da ZO é feita com ACN contendo 1% de ácido fórmico (MISTRI

et al., 2008) e diclorometano contendo 20% de isopropanol e 4% de hidróxido de amônio (NORDGREN; BODIN; BECK, 2002) .

Os melhores resultados foram obtidos nas condições descritas a seguir. O cartucho C18 (500 mg, 6 mL) foi ativado com 2 mL de metanol e lavado com 1 mL de água. Após esse procedimento de ativação, a amostra foi transferida para o cartucho que, em seguida, foi lavado com 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 6,0, seguido de 2 mL de ACN:água (5:95, v/v). Depois da lavagem, o cartucho foi seco durante 1 min por aplicação de pressão reduzida. A eluição do fármaco e IS foi realizada com 3 mL de diclorometano-isopropanol (80:20, v/v) na vazão de 2 mL min^{-1}. O controle dessa vazão foi possível controlando a intensidade do vácuo dentro da cuba utilizada. Todo solvente de eluição que passou pelo cartucho foi coletado e evaporado até a secura sob fluxo de ar comprimido. O resíduo obtido foi dissolvido em 50 µL da fase móvel. Durante o procedimento de ativação, adição da amostra e lavagem, o cartucho foi mantido sempre em contato com a solução evitando a sua secagem entre uma etapa e outra.

4.4.3 Validação do método bioanalítico desenvolvido

A validação do método foi efetuada de maneira similar ao descrito no Capítulo 3, item 3.3.2.5. Foram avaliados os parâmetros seletividade, efeito da matriz na ionização dos analitos, linearidade, recuperação, precisão, exatidão, limite de quantificação, estabilidade e robustez do método. A moclobemida foi utilizada como padrão interno.

4.4.3.1 Seletividade

O método mostrou-se seletivo para os enantiômeros da ZO frente à matriz estudada, o que pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 4.4.** A análise de um branco de cérebro de ratos mostrou ausência de interferentes da matriz co-eluindo com os analitos de interesse.

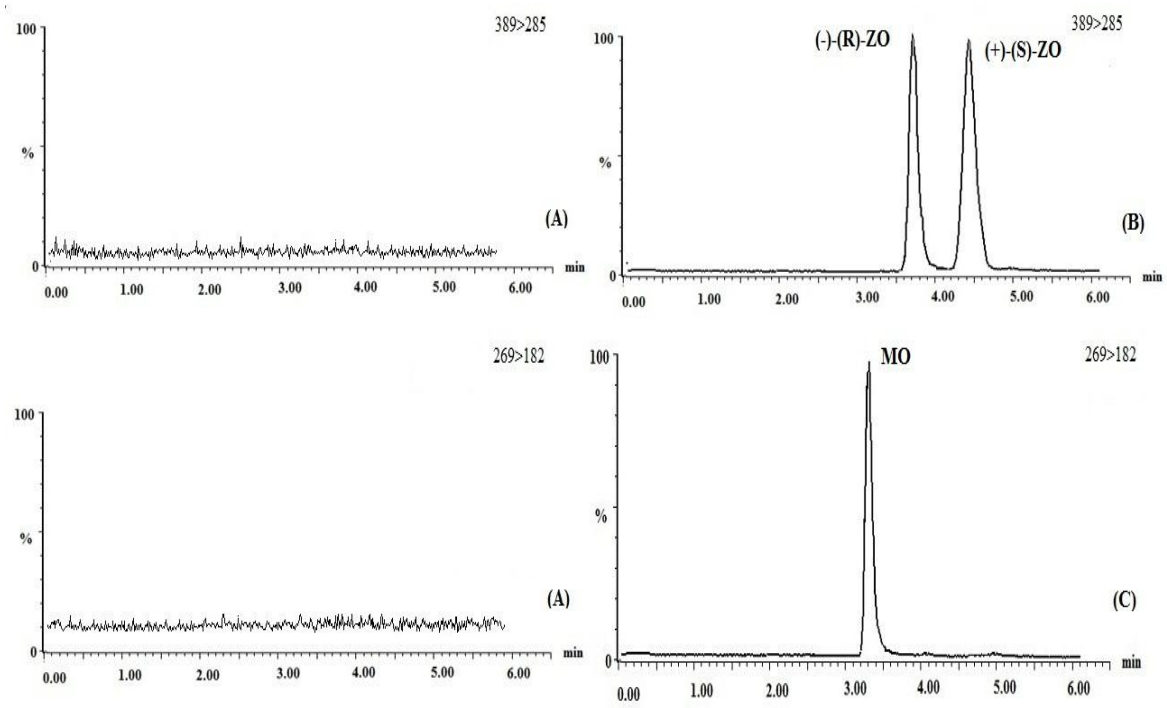


Figura 4.4. Cromatogramas referentes à análise quiral da ZO em amostras de cérebro de ratos. (A) branco de cérebro de ratos, (B) ZO na concentração de 57,5 ng g^{-1} de cada enantiômero (C) MO na concentração 1 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD, fase móvel constituída por ACN: etanol:metanol (60:20:20, v/v/v), vazão: 1,3 mL min^{-1}.

4.4.3.2 Efeito da matriz na ionização dos analitos

Os valores obtidos na avaliação do efeito da matriz foram inferiores a 15 % (**Tabela 4.1**), mostrando que as áreas dos picos do analito de soluções-padrão não diferem das áreas obtidas para o analito fortificado em um extrato de cérebro de ratos, obtido de acordo com o procedimento de preparação das amostras otimizado.

Tabela 4.1 Efeito da matriz na análise de ZO e MO em cérebro de ratos.

Analitos	**(-)-(R)- ZO**		**(+)-(S)-ZO**		**MO (IS)**	
Concentração (ng g^{-1})	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)	E (%)	CV (%)
1,0					-3,6	1,0
0,29	-13,1	3,3	-12,3	12,3		
57,5	-11,7	2,5	-12,8	7,2		
229,9	-8,9	7,9	-13,1	10,2		

4.4.3.3 Linearidade

Os dados apresentados na **Tabela 4.2** mostram que no intervalo estudado, 0,29 a 344,8 ng de cada enantiômero da ZO por grama de cérebro, a linearidade do método foi satisfatória, com coeficientes de correlação linear maiores que 0,99. Para o tratamento dos dados obtidos empregou-se uma ponderação de $1/x^2$. Os resultados do teste ANOVA indicam que não houve desvio de linearidade (valores de *p* menores que 0,05 e valores de F significativamente maiores que o crítico).

Tabela 4.2. Linearidade do método de análise de ZO em cérebro de ratos.

Analitos	Linearidade			ANOVA	
	Intervalo (ng g^{-1})	Equação da reta	Coeficiente de correlação	Valor de (*F*)	Valor de ($F_{critico}$)
(-)-(R)-ZO	0,29 a 344,8	y= 0,004753423x +0,008711972	0,996	249	1,99
(+)-(S)-ZO	0,29 a 344,8	y= 0,00670375x +0,010326208	0,997	340	1,99

4.4.3.4 Recuperação

A recuperação do método foi avaliada comparando-se os valores obtidos de amostras fortificadas nas concentrações de 0,29, 57,5 e 229,9 ng g^{-1} e submetidas ao procedimento de extração, com valores obtidos de soluções-padrão não submetidas ao processo de extração. A recuperação média foi de 89,6 e 91,6 % com desvios padrão relativos não superiores a 15 %, conforme apresentado na **Tabela 4.3.**

Tabela 4.3. Recuperação do método de análise de ZO em cérebro de ratos.

Analitos	Concentração (ng mL^{-1}, *n* = 3)[a]	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação média (%)	CV (%)
(-)-(R)-ZO	0,29	90,0	11,1	89,6	1,8
	57,5	87,9	9,2		
	229,9	91,0	1,1		
(+)-(S)-ZO	0,29	82,4	7,1	91,7	8,9
	57,5	97,6	1,0		
	229,9	95,2	6,5		

No método aquiral descrito por Mistri et al. (2008), os autores empregam a SPE na extração da ZO e seus metabólitos de plasma humano para posterior análise por LC-MS-MS. Esses autores descrevem recuperação média de 90% utilizando a SPE e cartuchos DVB-HL. Assim, os valores obtidos na extração da ZO em cérebro de ratos utilizando cartuchos C18 estão próximos aos reportados na literatura.

4.4.3.5 Precisão e exatidão

A **Tabela 4.4** mostra os valores obtidos no estudo da precisão e exatidão do método. Foram empregadas amostras de cérebro de ratos fortificadas em três níveis de concentração: 0,29, 57,5 e 229,9 ng g^{-1}. A precisão e exatidão intraensaio foram avaliadas através da análise de 5 amostras em cada concentração no mesmo dia. A precisão e exatidão interensaios foram avaliadas pela análise em quintuplicata de cada concentração, durante três dias. Os valores obtidos apresentados estão de acordo com os guias de validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003; FDA, 2001), mantendo-se abaixo de 15 %.

Tabela 4.4. Precisão e exatidão do método de análise de ZO em cérebro de ratos.

Analitos	Intraensaio (n = 5)[a]			Interensaios (n = 3)[b]		
	Concentração (ng mL^{-1})	CV (%)	E (%)	Concentração (ng mL^{-1})	CV (%)	E (%)
(-)-(R)- ZO						
0,29 ng g $^{-1}$	0,28	7,1	-4,9	0,30	12,3	3,1
57,5 ng g $^{-1}$	53,89	2,3	-6,3	55,52	11,9	-3,5
229,9 ng g $^{-1}$	228,17	3,3	-0,8	210,23	9,8	-8,6
S-(+)-ZO						
0,29 ng g $^{-1}$	0,29	5,6	-0,9	0,32	13,5	10,9
57,5 ng g $^{-1}$	57,41	7,7	-0,2	58,74	12,6	2,2
229,9 ng g $^{-1}$	230,11	2,6	0,1	219,89	9,6	-4,4

4.4.3.6 Limite de quantificação

O método desenvolvido mostrou limite de quantificação de 0,29 ng g^{-1} para cada enantiômero da ZO, com coeficientes de variação e erros relativos dentro do especificado pelos guias de validação de métodos bioanalíticos (**Tabela 4.5**). Esse limite de quantificação é bem inferior ao obtido por Fernandez et al., 2002 que foi de 9 ng g $^{-1}$.

Tabela 4.5. Limite de quantificação do método de análise de ZO em cérebro de ratos.

Analitos	LOQ (ng g^{-1})	E (%)	CV (%)
(R)-(-)- ZO	0,29	4,0	9,3
(S)-(+)-ZO	0,29	5,6	7,6

4.4.3.7 Estabilidade

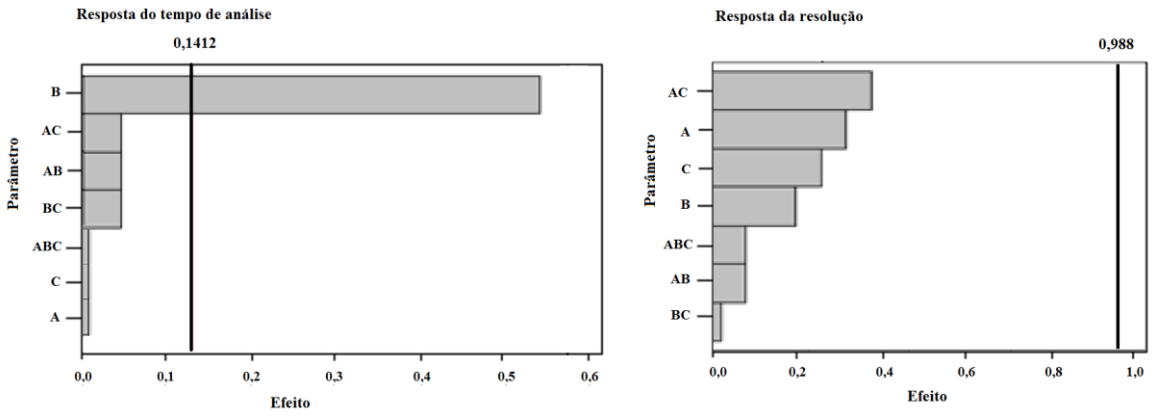
Os valores obtidos nesse estudo comprovam a estabilidade da ZO no cérebro durante o período deste estudo nas condições descritas de armazenamento e de análise. Os resultados obtidos no estudo de estabilidade estão representados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Estabilidade do método de análise de ZO em cérebro de ratos.

Analitos	**Estabilidade Bancada (*n* = 3)**		**Congelamento e descongelamento (*n* = 3)**		**Longa Duração (*n* = 3)**	
	CV (%)	**E (%)**	**CV (%)**	**E (%)**	**CV (%)**	**E (%)**
R-(-)- ZO						
0,29 ng g^{-1}	15,0	-9,8	12,5	-11,0	14,5	-13,1
229,9 ng g^{-1}	8,6	-2,6	8,6	-6,8	2,3	-12,4
S-(+)-ZO						
0,29 ng g^{-1}	10,1	-8,1	4,0	-10,4	6,6	-7,1
229,9 ng g^{-1}	5,6	-1,5	5,6	-4,0	1,1	-13,9

4.4.3.8 Robustez

Os resultados obtidos na avaliação da robustez do método foram processados pelo software Minitab. Os fatores, avaliados pelo gráfico de Pareto, foram: procedência da acetonitrila (Tedia e Merck), vazão da fase móvel (1,2 mL min^{-1} e 1,4 mL min^{-1}) e porcentagem de etanol (15 e 25 %). Esses fatores correspondem respectivamente aos códigos A, B e C. A representação gráfica segue os mesmos parâmetros descritos no item 3.4.3.8. Portanto, o fator vazão da fase móvel foi significativo na resposta do tempo de análise. Assim, esse deve ser monitorado sempre que o método for aplicado. Nenhum dos fatores interferiu significativamente na área da ZO. Os demais resultados (**Figura 4.5**) mostram que os fatores avaliados não foram estatisticamente significantes para interferir no resultado, comprovando assim a robustez do método.



(A) **(B)**

Figura 4.5 Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações no tempo de análise da ZO (a) e na resolução dos enantiômeros da ZO (b). A linha vertical representa o valor de t-crítico.

4.4.4 Aplicação do método

O método validado foi aplicado em um estudo piloto de disposição cinética em ratos. A **Figura 4.6** e a **Tabela 4.7** mostram as concentrações dos enantiômeros da ZO presentes no cérebro de um grupo de ratos Wistar machos, jovens e saudáveis, após receber uma dose de 3 mg de ZO por kg de peso corporal, em função do tempo de coleta. Pode-se observar que os níveis de (+)-(S)-ZO, o enatiômero com maior atividade, foram sempre superiores aos de (-)-(R)-ZO. Esses resultados concordam com estudos anteriores sobre a disposição cinética estereosseletiva da ZO em cérebro ratos (FERNANDEZ et al., 2002).

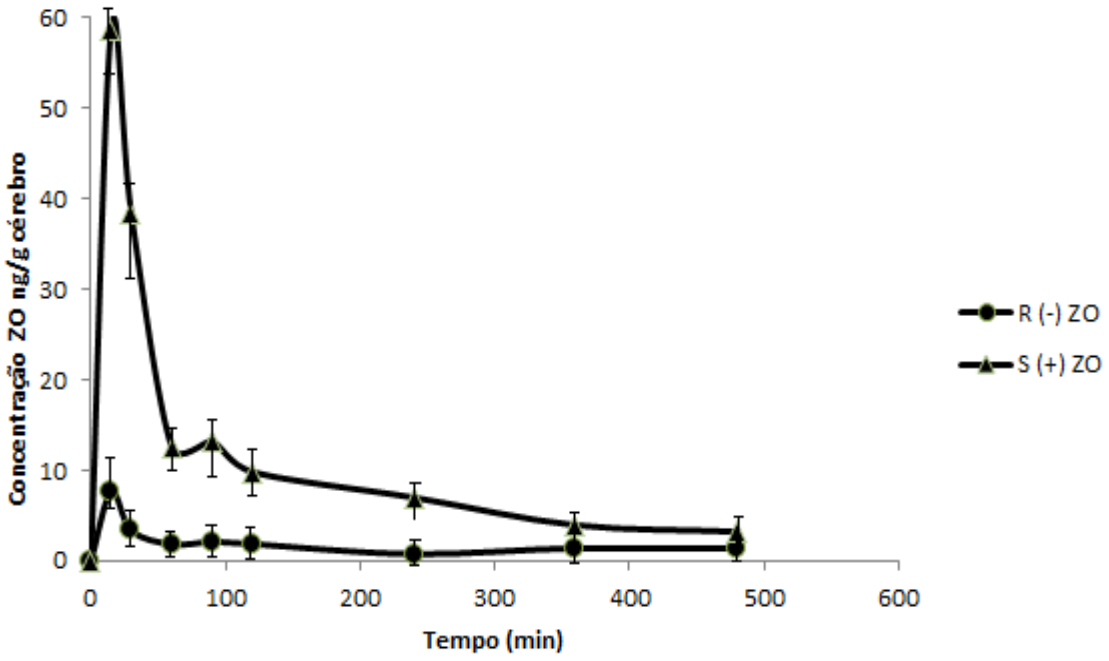


Figura 4.6. Gráfico da concentração dos enantiômeros da ZO em cérebro de ratos *versus* tempo de coleta. As barras expressam o desvio padrão das replicatas (n=6).

Tabela 4.7 Concentração dos enantiômeros da ZO em cérebro de ratos *versus* tempo de coleta

Tempo de análise (minutos)	(-)-(R)- ZO (ng g^{-1})	(+)-(S)-ZO (ng g^{-1})
15	7,62	58,74
30	3,34	38,38
60	1,82	12,62
90	2,11	13,21
120	1,87	9,83
240	0,76	6,99
360	1,40	3,96
480	1,37	3,23

Análise enantiosseletiva da ZO e suas impurezas

5. ANÁLISE ENANTIOSSELETIVA DA ZO E SUAS IMPUREZAS

5.1 INTRODUÇÃO

No contexto da indústria farmacêutica, o controle de qualidade de fármacos é de vital importância uma vez que erros de concentração, possíveis degradações, interações entre componentes de uma forma farmacêutica ou fatores externos podem ocasionar alterações na composição do medicamento, alterando a qualidade do mesmo e assim pondo em riscos a saúde dos pacientes. Portanto, a utilização de ferramentas de análise em rotinas de controle de qualidade se mostra essencial para garantir a qualidade dos produtos comercializados.

A qualidade das matérias-primas tem influência direta na qualidade dos medicamentos. Assim como para o produto final, a qualidade da matéria prima deve sempre ser avaliada através de procedimentos analíticos descritos em monografias vigentes ou métodos analíticos previamente validados. A ANVISA (2003) estabelece os parâmetros para a validação desses métodos através da RE nº899 de 29 de maio de 2003.

A importância do papel da esteroquímica nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos quirais tem sido cada vez mais reconhecida pela indústria farmacêutica e, dessa forma, a tendência atual é o desenvolvimento de novos fármacos na forma de enantiômeros puros (HUTT; VALENTOVÁ, 2003). Outra tendência é a de comercialização de fármacos já disponíveis como racematos, agora na forma de enantiômero puro (*chiral switch*). Neste cenário, várias empresas conseguiram estender o período de patente de seus fármacos com o estudo, desenvolvimento, produção e comercialização do enantiômero puro de um racemato original. Essa estratégia tornou-se um forte atrativo para a indústria, pois muitos estudos clínicos necessários para o enantiômero puro já tinham sido realizados durante o desenvolvimento do racemato (AGRANAT; WAINSCHTEIN, 2010).

Apesar disso, a comercialização de um enantiômero puro não leva sempre a uma maior eficácia e segurança no tratamento. Estudos *in vitro* realizados com a talidomida mostraram que o enantiômero -(R) sofre um processo de inversão quiral levando a formação do outro enantiômero que possui ação teratogênica (KNOCHE; BLASCHKE, 1994). Sendo assim, a comercialização do fármaco na forma de enantiômero puro exige métodos estereosseletivos para possibilitar a realização de estudos de controle de qualidade da matéria-prima e formulação farmacêutica, testes de dissolução e de estabilidade.

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem. Esses fatores podem ocasionar uma degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico bem como a estereoconversão de fármacos comercializados como enantiômeros puros (ANVISA, 2005).

Infelizmente, a legislação brasileira vigente é pouco clara e de contribuição discreta para a divulgação, estudo e controle do tema relacionado com a importância da estereoquímica na farmacodinâmica e farmacocinética de um fármaco (ORLANDO et al., 2007). A ANVISA (2007) estabelece através da resolução nº16, de 02 de março de 2007, as exigências sobre os medicamentos genéricos. No âmbito da quiralidade, consta apenas que a empresa solicitante deverá encaminhar cópia da documentação original do fabricante do seu ativo com os dados sobre os teores dos estereoisômeros.

No Brasil, a ZO é comercializada como racemato, em comprimidos revestidos de 7,5 mg, sob a denominação de IMOVANE (Sanofi-Aventis Farmacêutica LTDA). Segundo a farmacopéia européia, a identificação da ZO é feita por espectrofotometria no UV, espectrofotometria por absorção no infravermelho e cromatografia em camada delgada. A análise das substâncias relacionadas, descritas como impurezas A (N-Ox ou RP29753), impureza B (RP29307) e impureza C (2-amino-5-cloropiridina, ACP ou RP26695) (**Figura 5.1**) é realizada por HPLC (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008).

A substância RP 29307 é uma impureza pré-existente na ZO oriunda da sua síntese. Esta substância pode ser formada também por hidrólise da ZO durante sua estocagem. Outro potente produto de degradação durante a estocagem é a substância ACP. A substância RP 48497 é formada por fotodegradação, (PIPERAKI; PARISI-POULOU, 1996).

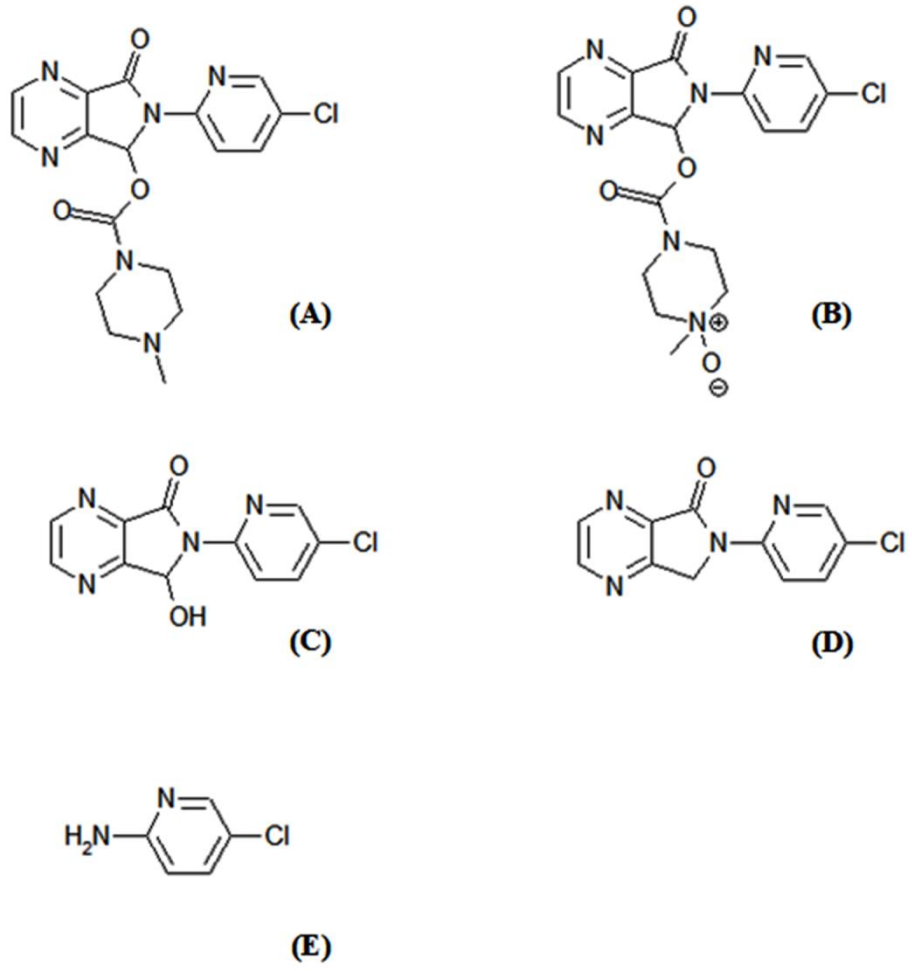


Figura 5.1. Estruturas químicas da ZO (A) e impurezas N-Ox (B), RP 29307 (C), RP 48497 (D) e 2-amino-5-cloropiridina (E).

A análise não-enantiosseletiva da ZO e suas impurezas nas matérias-primas e formulações farmacêuticas tem sido relatada em poucos estudos. Em 1994, Bourine et al. relataram um método não enantiosseletivo para a separação de ZO e seus produtos de degradação (RP 29307, N-Ox, RP 48497 e ACP) em comprimidos usando uma coluna LiChrospher 60 - RP Select B. A análise da ZO em comprimidos usando uma coluna C18 e detecção UV foi descrita por Paw e Misztal (2000). Em outro estudo, a técnica de voltametria adsortiva foi utilizada para determinar ZO em comprimidos e urina humana (YILMAZ, 2009).

A literatura descreve alguns métodos para a análise enantiosseletiva da ZO empregando HPLC, mas quase todos eles são métodos bioanalíticos para quantificar ZO e seus metabólitos em diferentes matrizes (FERNANDEZ et al., 1991, 1993, 2002, FOSTER et al.,1994; GEBAUER; ALDERMAN, 2002). Um método semi-preparativo quiral para a separação de enantiômeros da ZO usando a coluna CHIRALPAK AS foi descrito por Mannaert e Daenens (1996).

A separação dos enantiômeros da ZO, seus metabólitos (N-Ox e N-Des) e impurezas (ACP, RP 29307 e RP 48497) foi relatada por Piperaki e Parissi-Poulou (1996), usando uma fase estacionária derivada de β-ciclodextrina. Entretanto, não há dados de validação para este método ou sua aplicação a formulações farmacêuticas ou material biológico.

A CE também tem sido utilizada para a análise enantiosseletiva da ZO e seus metabólitos na urina (HEMPEL; BLASCHKE, 1996) e para a análise da ZO e seu precursor sintético (GOMIS et al., 2009). Em ambos os métodos, a β-ciclodextrina foi usada como seletor quiral. Em outro trabalho, o seletor quiral escolhido foi a β-ciclodextrina carboximetilada. Neste caso, os autores empregaram a técnica para avaliar a ligação enantiosseletiva dos enantiômeros da ZO à albumina humana e proteínas totais do plasma (ASENSI-BERNARDI, et al. 2011). Portanto, nenhum método empregando essa técnica foi descrito na literatura para análise enantiosseletiva da ZO e de suas impurezas.

Segundo Fernandez et al. (1995), a ZO é instável em solventes nucleofílicos e sua racemização ocorre principalmente em altas temperaturas e meio básico. Esses autores não observaram degradação ou racemização em materiais biológicos.

Recentemente, Gebauer e Alderman (2002) avaliaram a estabilidade da ZO em ACN, não observando qualquer decomposição quando as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar por até 6 meses, em temperatura ambiente. Em contrapartida, a ZO apresentou limitada estabilidade no sangue; a concentração foi reduzida em 25% e 29% para cada um dos enantiômeros depois de mantidos a temperatura ambiente por 20 horas. No plasma, observaram estabilidade da ZO por seis meses quando as amostras foram mantidas a temperatura de – 20 ^{0}C.

5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Desenvolver e validar um método de análise enantiosseletiva para quantificação simultânea da ZO e suas impurezas em comprimidos, empregando LC-UV e CE-UV, com aplicação no controle de qualidade de formulações farmacêuticas e no estudo da degradação e racemização do fármaco.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Materiais

5.3.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes etanol, metanol, isopropanol, ACN e hexano e o reagente DEA foram obtidos conforme descrito no Capítulo 3, item 3.3.1.1. No preparo das soluções tampão foram utilizados fosfato monossódico monoidratado, fosfato dissódico diidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), borato de sódio e ácido bórico (J.T. Baker, Philipsburg, NJ, EUA), todos grau analítico. O ácido clorídrico (37 %) (J.T. Baker, Philipsburg, NJ, EUA) e o hidróxido de sódio (Spectrum Chemical Corp, Gardena, CA, EUA) também foram grau analítico. A água utilizada nos experimentos foi purificada no sistema Milli-Q Plus System (Millipore, Bedford, MA, EUA).

5.3.1.2 Soluções-padrão

ZO e ACP foram gentilmente cedidas por Arrow Farmacêutica LTDA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A impureza N-Ox e RP29307 foram obtidas da Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). O medicamento IMOVANE (Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda), em comprimidos revestidos para administração oral com 7,5 mg de ZO, foi comprado em farmácia local (Ribeirão Preto, SP, Brasil). As soluções-padrão de ZO, N-Ox, ACP, RP29307 foram preparadas na concentração de 100 µg mL^{-1} em ACN. Alíquotas de 25 µL das soluções-padrão foram evaporadas a secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram

dissolvidos em 100 µL de fase móvel para posterior análise por LC-UV. As soluções-padrão empregadas na otimização do método por CE também foram preparadas em ACN na concentração de 100 µg mL^{-1}. . Alíquotas de 10 µL dessas soluções foram evaporadas a secura sob fluxo de ar comprimido e os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de água:ACN (9:1, v/v). Os padrões de calibração empregados na validação do método foram preparados em ACN, na faixa de concentração de 0,4-0,8 mg mL^{-1} para os enantiômeros da ZO, 0,8-1,6 µg mL^{-1} para o ACP e 0,4 - 0,8 µg mL^{-1} para os enantiômeros da N-Ox e da RP29307. Trimetoprina (TRI, **Figura 5.2**), usada como IS, foi obtida da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha). A solução de TRI foi preparada em metanol na concentração de 20 µg mL^{-1}.

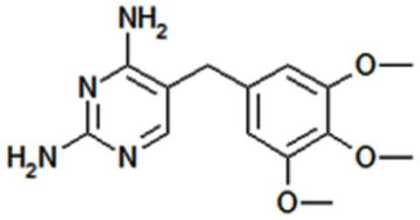


Figura 5.2 Estrutura química da trimetoprina utilizada como padrão interno.

5.3.1.3 Equipamentos e acessórios

O sistema cromatográfico utilizado (Shimadzu, Kyoto, Japan) era composto por uma bomba LC10AS, um sistema controlador modelo SLC 10A, um injetor Rheodyne modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, EUA) com amostrador de 20 µL e um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A, operando em 305 nm. O controle do sistema cromatográfico e a aquisição dos dados foi feito empregando o software LCsolution® versão 1.22 SP1. As colunas descritas abaixo foram avaliadas visando obter a separação dos enantiômeros da ZO e de suas impurezas.

- Coluna CHIRALPAK AD (250 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose recobrindo partículas de sílica de 10 µm de diâmetro.

- Coluna CHIRALPAK AD-RH (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída pelo derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

- Coluna CHIRALCEL OD-H (150 x 4,6 mm, Chiral Technologies, Exton, PA, EUA), constituída de derivado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose recobrindo partículas de sílica de 5 µm de diâmetro.

A separação dos enantiômeros da ZO e de suas impurezas também foi avaliada por CE empregando um sistema modelo G1601BA (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com detector por arranjo de diodos, amostrador automático e software ChemStation CE para aquisição e processamento de dados. A separação enantiomérica foi realizada em um capilar de sílica fundida (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) recoberto por uma camada de poliimida. As dimensões do capilar foram: 50 cm de comprimento total, 42 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno. Os seletores quirais relacionados abaixo foram avaliados no modo de polaridade normal:

- β-ciclodextrina (β-CD), obtida da Thermo Separation Products (Santa, FC, Novo Mexico);
- 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), obtida da Aldrich (Milwaukee, WI, EUA);
- Heptakis (2,6-di-*O*-metil)-β-ciclodextrina (DM-β-CD), obtida da Aldrich (Milwaukee, WI, EUA);

- Heptakis (2,3,6-tri-*O*-metil)-β-ciclodextrina (TM-β-CD), obtida da Fluka (Buch, Suíça).
- β-ciclodextrina carboximetilada (CM- β-CD) obtida da Fluka (Buchs, Suiça)
- β-ciclodextrina sulfatada (S- β-CD) da Supelco (Bellefonte, PE, EUA).

As soluções de eletrólitos com e sem o seletor quiral, as soluções de hidróxido de sódio e a água foram filtradas em filtro Millex-HA (0,45 µm) da Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA). Após filtração, as soluções foram degaseificadas no ultrasson por 5 minutos e utilizadas na análise.

No estudo de estabilidade, foi empregado um equipamento com luz ultravioleta em 245 nm, Modelo 131101, Desago GmBH (Heidelberg, Alemanha). Outros equipamentos utilizados foram já descritos no Capítulo 3, item 3.3.1.4.

5.3.2 Método

5.3.2.1 Avaliação das colunas quirais

A preparação das fases móveis empregadas no modo normal e polar orgânico foi feita conforme descrito no Capítulo 3, item 3.3.1.5. As três colunas quirais foram empregadas no modo normal de eluição. A coluna CHIRALPAK AD-RH foi avaliada também no modo polar orgânico.

5.3.2.2 Otimização da separação dos enantiômeros da ZO e de suas impurezas por CE

Antes da primeira utilização, o capilar foi condicionado por lavagem com solução de NaOH 1 mol L^{-1} durante 30 min, seguido de água por 30 min. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} por 10 min e água por 10 min. Antes de cada análise, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} por 1 min, água por 1 min e tampão de análise durante 2 min. Essa condição foi otimizada a fim de garantir maior repetibilidade do método. No final de cada dia de análise, o capilar foi lavado com solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} por 15 min, seguido de água por mais 15 min. O capilar foi mantido em água no período no qual não foi utilizado.

Todos os experimentos foram realizados no modo de polaridade normal. A injeção hidrodinâmica dos analitos (soluções-padrão evaporadas a secura sob fluxo de ar comprimido e resíduos dissolvidos em 100 µL de água:ACN (9:1, v/v)) foi realizada através da aplicação de uma pressão de 55 mbar por 30s. O detector por arranjo de diodos foi operado em 305 nm para a ZO e suas impurezas e 200 nm para o IS.

Na etapa de otimização foram avaliados várias condições e parâmetros do método como: seletor quiral mais adequado (β-CD; HP-β-CD; DM-β-CD; TM-β-CD; CM-β-CD; S-β-CD), concentração do seletor quiral (0,5-20 mg mL^{-1}), pH da fase móvel (2,5 - 10), composição da fase móvel (tampão fosfato de sódio, tampão borato de sódio), concentração do tampão (50-100 mmol L^{-1}), pré-condicionamento do capilar, temperatura de análise (23-28ºC) e tensão aplicada (20-30 kV).

5.3.2.3 Ordem de migração eletroforética

ACP é uma substância não quiral. Assim, a ordem de migração foi determinada apenas para os enantiômeros da ZO e da N-Ox. Os enantiômeros isolados foram obtidos por separação em escala semi-preparativa empregando o método descrito no Capítulo 3. As frações coletadas na saída da coluna, contendo cada um dos enantiômeros, foram evaporadas a secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de água:ACN (9:1, v/v) e analisados usando o método CE.

5.3.2.4. Procedimento de preparação da amostra

Vinte comprimidos foram pesados e macerados até a obtenção de um pó fino. A massa média obtida para esses comprimidos foi de 173,98 mg. Para preparação das amostras controle usadas na validação, uma quantidade desse pó equivalente a 1,0 mg de ZO foi transferida para um frasco volumétrico de 1 mL, com auxílio de 750 µL de ACN. A amostra foi então sonicada durante 10 minutos e depois o volume foi completado com ACN. Em seguida, a amostra foi filtrada utilizando filtro Millex-HA (0,45 µm). Depois da filtração, 50 µL dessa solução foram adicionados de 50 µL das soluções-padrão da impureza N-Ox (0,4 µg mL^{-1}, 0,5 µg mL^{-1} ou 0,6 µg mL^{-1}), e ACP (0,8 µg mL^{-1}, 1 µg mL^{-1} ou 1,2 µg mL^{-1}) e 25 µL da solução do IS. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi dissolvido em 100 µL de água: ACN (9:1, v/v) e injetado no capilar. O mesmo procedimento foi seguido para obtenção das amostras nas quais se pretendia apenas quantificar os enantiômeros da ZO, exceto pela adição das impurezas.

5.3.2.5 Validação do método

Em função dos resultados obtidos na avaliação das colunas quirais (HPLC) e seletores quirais (CE), a eletroforese capilar foi a técnica escolhida para finalizar o método de análise enantiosseletiva da ZO e de suas impurezas. Após a definição de todos os parâmetros procedeu-se a validação analítica do método, avaliando os principais parâmetros recomendados pelas agências regulamentadoras, referentes a análise de fármacos em produtos farmacêuticos (FDA, 2001; ANVISA, 2003)

A seletividade do método foi avaliada através do estudo da interferência dos produtos de degradação obtidos em diferentes condições de estresse. A seletividade do método também foi estabelecida através da avaliação da pureza dos picos dos enantiômeros da ZO nas amostras degradadas, usando o detector por arranjo de diodos.

A linearidade do método foi determinada pela análise de soluções-padrão de ZO e de suas impurezas em cinco diferentes concentrações: 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 mg mL^{-1} para cada enantiômero da ZO; 0,8, 1,0, 1,2, 1,4 e 1,6 µg mL^{-1} para o ACP e 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 µg mL^{-1} para cada enantiômero da N-Ox. TRI (20 µg mL^{-1}) foi utilizado como padrão interno. Foram feitas cinco injeções para cada concentração.

O limite de quantificação (LOQ) corresponde a menor concentração da curva analítica que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis. De acordo com a recomendação dos guias oficiais, o LOQ deve ser determinado apenas para as impurezas. O LOQ foi determinado através da análise, em quintuplicata, de soluções da amostra do medicamento IMOVANE fortificada com ACP na concentração de 0,8 µg mL^{-1} e N-Ox na concentração de 0,4 µg mL^{-1} para cada enantiômero.. Os limites de detecção (LOD) para as impurezas foram determinados considerando uma relação sinal-ruído de 3:1.

A exatidão do método foi avaliada fortificando soluções da amostra do medicamento IMOVANE com quantidades conhecidas de ZO e suas impurezas. Alíquotas de 50 µL de soluções-padrão de ZO (0,4, 0,5 e 0,6 mg mL^{-1} para cada enantiômero) e de suas impurezas (0,8, 1,0 e 1,2 µg mL^{-1} para o ACP e 0,4, 0,5 e 0,6 µg mL^{-1} para cada enantiômero da N-Ox) foram adicionadas à solução da amostra de comprimido (0,5 mg mL^{-1} de cada enantiômero ZO). Depois disso, o IS, TRI (20 mg mL^{-1}), foi adicionado.

A precisão intraensaios foi avaliada analisando seis preparações independentes da amostra (concentrações de 0,5 mg mL^{-1} de cada enantiômero da ZO, 1,0 µg mL^{-1} do ACP e 0,5 µg mL^{-1} de cada enantiômero da N-Ox) em um mesmo dia. A precisão interensaios foi verificada através da análise de amostras nessas mesmas concentrações preparadas em três dias consecutivos.

Na avaliação da robustez, foi avaliada a influência de pequenas variações nas condições do método descrito, realizando um estudo fatorial completo de 2 níveis (2^4), resultando assim em 16 experimentos (**Tabela 5.1**). Os fatores avaliados foram concentração do seletor quiral CM- β-CD (4,5 e 5,5 mmol L^{-1}), temperatura do capilar (24 °C e 26 °C), tensão aplicada (26 kV e 28 kV) e concentração do tampão fosfato de sódio (75 e 85 mmol L^{-1}). As respostas avaliadas nos experimentos foram: resolução, área do pico e tempo de análise. As respostas obtidas foram processadas pelo software Minitab estatística 14 (State College, PA, EUA).

Tabela 5.1. Parâmetros avaliados no estudo fatorial completo da robustez do método

Análise	Temperatura (ºC)	Tensão (kV)	Concentração do tampão (mmol L^{-1})	Concentração de CD (mmol L^{-1})
01	26	28	85	4,5
02	24	28	85	4,5
03	24	26	75	5,5
04	26	26	85	4,5
05	24	26	85	5,5
06	24	28	85	5,5
07	24	26	85	4,5
08	26	26	75	5,5
09	26	28	85	5,5
10	26	28	75	4,5
11	24	28	75	4,5
12	26	28	75	5,5
13	24	28	75	5,5
14	24	26	75	4,5
15	26	26	75	4,5
16	26	26	85	5,5

5.3.2.6. Aplicação do método

Após a validação, o método foi utilizado para analisar os comprimidos de ZO disponíveis comercialmente (IMOVANE, comprimidos revestidos contendo 7,5 mg de ZO). As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 5.3.2.4. e analisadas com base em uma curva analítica no intervalo de 0,4 a 0,8 mg mL^{-1} para cada enantiômero de ZO, 0,8 a 1,6 µg mL^{-1} para o ACP e 0,4 a 0,8µg mL^{-1} para cada enantiômero da N-Ox.

O método validado foi também utilizado para estudar a degradação e racemização da ZO. Para este estudo, ZO como racemato e cada um de seus enantiômeros isolados foram submetidos a diferentes condições de estresse a fim de realizar o estudo de degradação forçada. Os enantiômeros da ZO foram obtidos por HPLC semi-preparativa nas condições anteriormente descritas no Capítulo 3, item 3.3.2.3. As frações contendo os enantiômeros isolados foram evaporadas à secura sob fluxo de ar comprimido e, em seguida, os resíduos foram dissolvidos em ACN.

A hidrólise ácida foi realizada com HCl 0,01 mol L^{-1}. Alíquotas de 100 µL de soluções de ZO racêmico (1 mg mL^{-1}, em ACN), (+)-(S)-ZO e (-)-(R)-ZO foram adicionadas de 900 µL da solução de HCl e foram hidrolisadas durante 0, 30, 60 e 120 minutos, a temperatura ambiente. Antes da análise por CE, as amostras foram neutralizadas com 900 uL da solução de NaOH 0,01 mol L^{-1} e diluídas com 100 uL de água.

A hidrólise alcalina foi realizada com NaOH 0,01 mol L^{-1} e a reação de oxidação com H_2O2 3%. O procedimento foi o mesmo descrito para a hidrólise ácida. Antes da análise por CE as amostras submetidas à hidrólise alcalina foram neutralizadas com solução de HCl 0,01 mol L^{-1}.

Para realizar o estudo de fotodegradação, as amostras foram expostas à radiação direta UV (245 nm) durante os seguintes períodos de tempo: 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, a temperatura ambiente. Amostras controle também foram preparadas e mantidas na ausência de luz, durante os mesmos períodos de tempo.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Análise por LC-UV

5.4.1.1 Separação quiral

Em função dos resultados obtidos e descritos no Capítulo 3, esta etapa do estudo foi realizada usando apenas as colunas CHIRALPAK AD, CHIRALPAK AD-H e CHIRALCEL OD–H, que haviam se mostrado adequadas para a separação dos enantiômeros da ZO. Na literatura, as duas principais colunas empregadas para a separação da ZO e seus metabólitos são a CHIRALCEL OD (FERNANDEZ et al., 1991, 1993, 2002) e CHIRALCEL OD-H (FOSTER et al.,1994; GEBAUER; ALDERMAN, 2002). Mannaert, Daenens (1996) utilizaram a coluna CHIRALPAK AS. Essa coluna não foi estudada nessa etapa de desenvolvimento, uma vez que os resultados obtidos com ela e descritos no Capítulo 3 não foram bons.

No momento em que o estudo começou a ser realizado, o laboratório possuía apenas os padrões do fármaco e da N-OX, que também é um produto de metabolização da ZO. Portanto, os testes foram iniciados tentando separar apenas os enantiômeros desses dois compostos.

A separação dos enantiômeros da ZO e da N-OX foi inicialmente avaliada na coluna CHIRALPAK AD em condição de fase normal. Nessas condições cromatográficas, observa-se a separação dos enantiômeros do fármaco e N-OX mas, quando os dois compostos são analisados juntos, ocorre a sobreposição dos picos (**Figura 5.3**). A coelução do fármaco e metabólito não foi observada quando essa coluna foi usada em condição de fase polar orgânica (Capítulo 3).

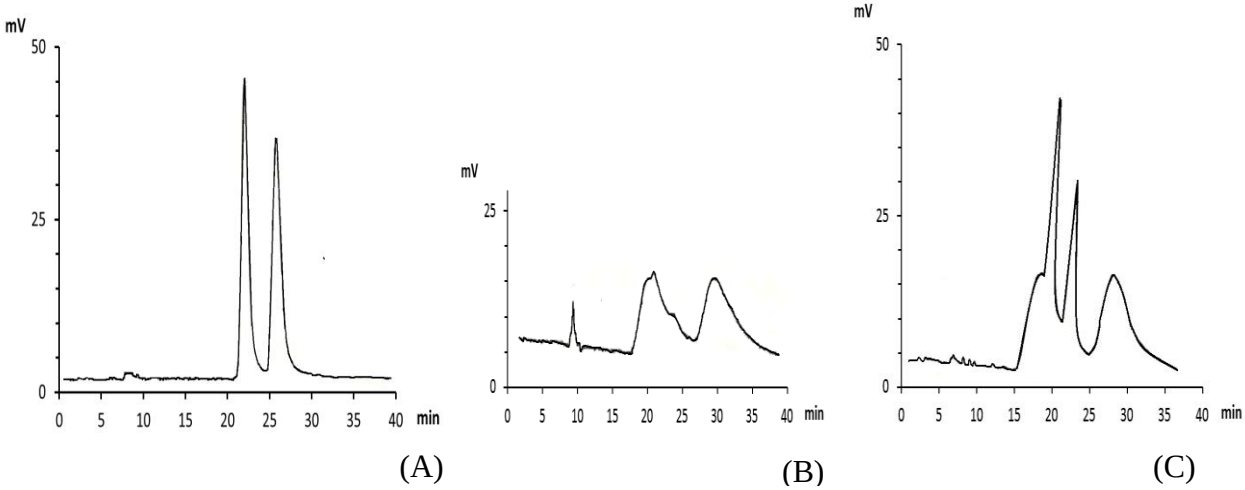


Figura 5.3. Cromatogramas das soluções-padrão de (A) ZO, (B) N-Ox e (C) ZO + N-Ox na coluna CHIRALPAK AD. Fase móvel constituída por hexano:isopropanol (6:4, v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305 nm.

Os resultados obtidos com a coluna CHIRALCEL OD-H também não foram satisfatórios (**Figura 5.4**), portanto, decidiu-se avaliar a separação usando a coluna CHIRALPAK AD-RH no modo polar orgânico que já havia dado bons resultados (Capítulo 3). Nesse caso, a impureza ACP também foi incluída nos testes.

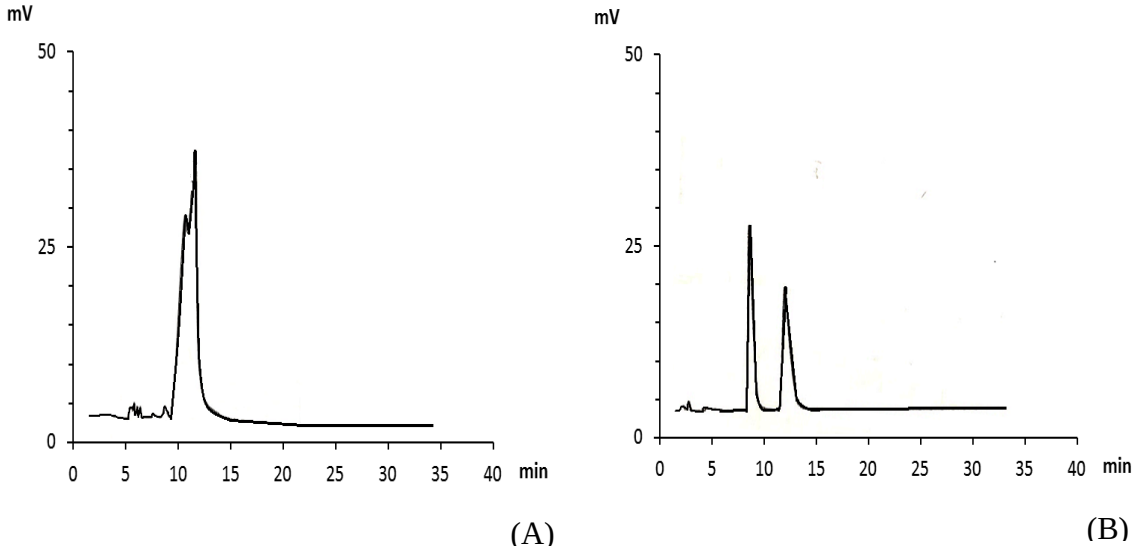


Figura 5.4. Cromatogramas das soluções-padrão de (A) N-Ox e (B) ZO na concentração de 100 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALCEL OD-H, fase móvel constituída por hexano:etanol (4:6, v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1}, detecção em 305 nm.

A separação adequada dos enantiômeros da ZO e suas impurezas ACP e N-OX foi obtida na coluna CHIRALPAK AD-RH com a fase móvel constituída por etanol:metanol (5:5, v/v) acrescida de 0,3 % de DEA (**Figura 5.5)**. A adição de 0,3% de DEA e o emprego da vazão de 1,0 mL min^{-1} tornou a análise mais rápida e melhorou a resolução.

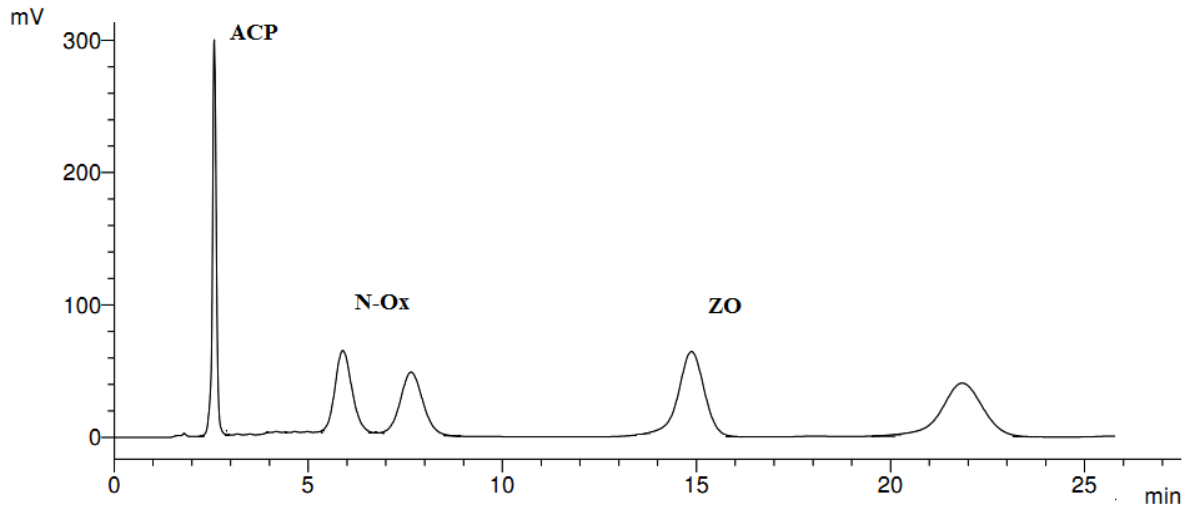


Figura 5.5. Cromatograma das soluções-padrão de ACP, N-Ox e ZO na concentração de 100 µg mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por etanol:metanol (5:5, v/v) contendo 0,3 % de DEA , vazão de 1,0 mL min^{-1}, detecção em 305 nm.

Durante o desenvolvimento do método, foi disponibilizado no mercado o acesso à impureza RP 29307. Para inclusão dessa impureza, foram necessários alguns ajustes na composição da fase móvel. Outra impureza, RP 48497, formada por fotodegradação não foi incluída no estudo devido a impossibilidade de obtenção do padrão analítico. A melhor condição cromatográfica (**Figura 5.6**) para a resolução da ZO e suas impurezas foi:

- **Coluna:** CHIRALPAK AD-RH
- **Fase móvel:** metanol:etanol:ACN (60:35:5, v/v/v) + 0,3% DEA
- **Vazão:** 0,6 mL min^{-1}
- **Comprimento de onda de detecção:** 305 nm

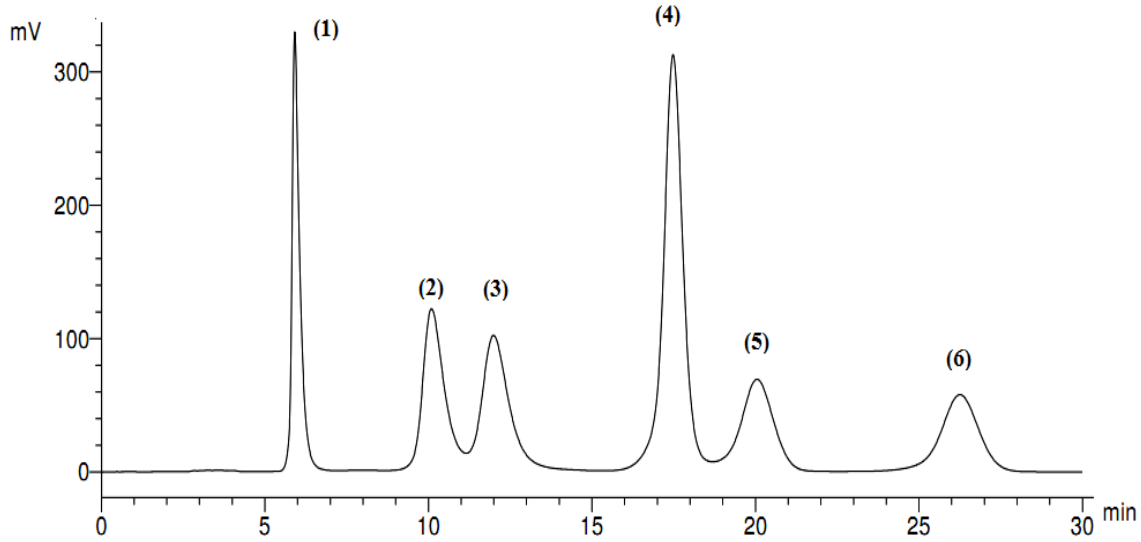


Figura 5.6. Cromatograma referente à análise da solução-padrão de ZO e de suas impurezas na concentração de 100 ug mL^{-1}. **(1)** Impureza ACP, **(2 e 3)** N-Ox, **(4)** enantiômero puro da impureza RP29307 da eszopiclona e **(5 e 6)** ZO. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por metanol:etanol:ACN (60:35:5, v/v/v) contendo 0,3% de DEA, vazão de 0,6 mL min^{-1}, detecção em 305 nm.

Como indicado na introdução deste capítulo, os métodos descritos para a análise da ZO, na maioria dos casos, são não enantiosseletivos e não avaliam as impurezas ou produtos de degradação deste fármaco. Apenas o trabalho descrito por Piperaki e Parissi-Poulou (1996) mostra a separação da ZO, seus metabólitos (N-Ox e N-Des) e impurezas (ACP, RP 29307 e RP 48497) usando uma fase estacionária derivada baseada em β-CD. Entretanto, não há dados de validação para este método ou sua aplicação na análise de formulações farmacêuticas ou material biológico. Além disso, a separação é feita em 40 minutos.

Para validação de um método é necessário estabelecer sua faixa de aplicação. Esta corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior dos analitos de interesse obtidos com precisão e exatidão adequadas. A ANVISA (2003) especifica um intervalo compreendido entre 80-120 % da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120 % do limite máximo especificado para determinação de impurezas.

No laudo do padrão da ZO consta que o limite máximo de impurezas permitido é de 0,1 % da concentração da ZO para as impurezas ACP e N-Ox e de 0,2 % para a impureza RP 29307 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Atendendo a essas especificações, as concentrações das impurezas nas soluções usadas para a validação devem ser 1000 vezes menores que as concentrações do fármaco. Quando uma amostra com essas características foi analisada pelo método desenvolvido, verificou-se que a resolução era insuficiente para permitir a quantificação da ZO e suas impurezas com especificidade adequada (**Figura 5.7**). Assim, a validação do método de análise da ZO e suas impurezas por HPLC não foi possível.

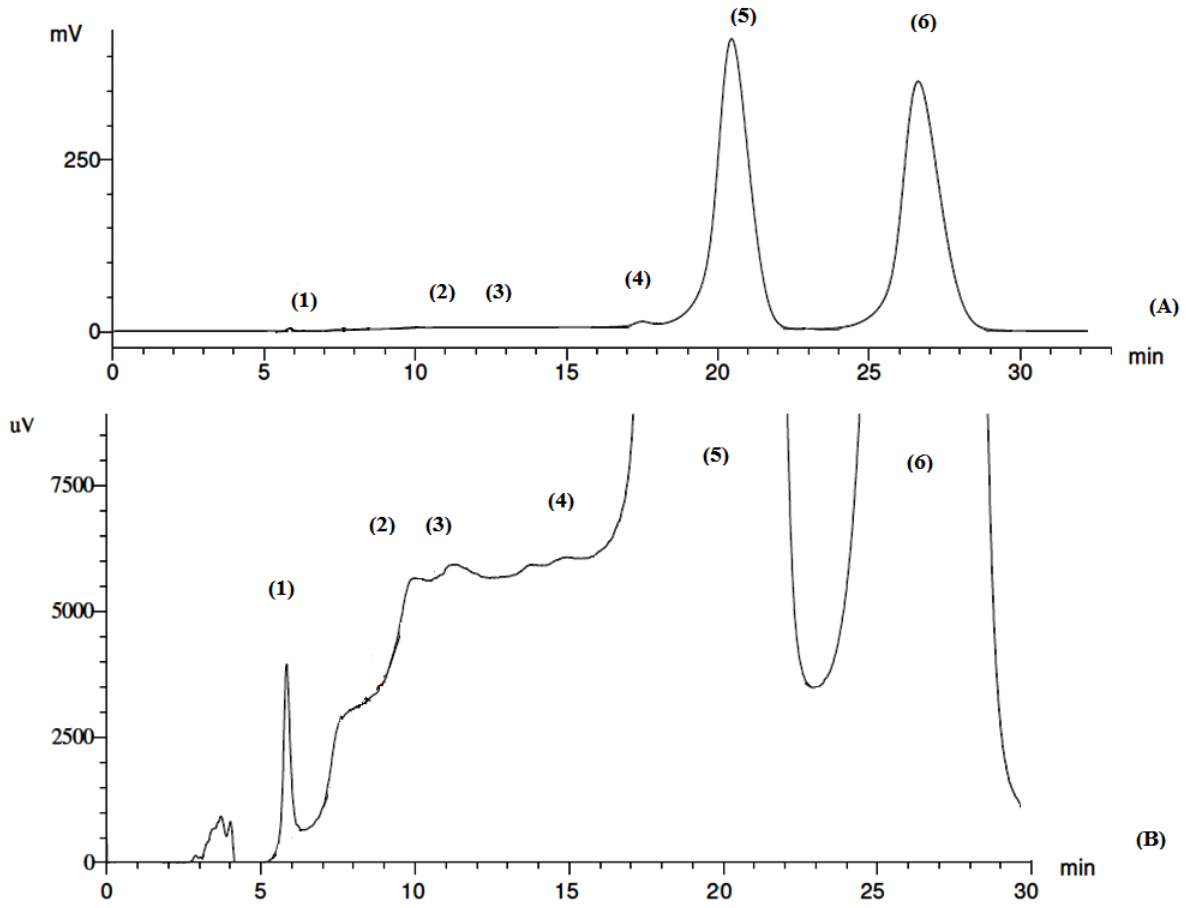


Figura 5.7. Cromatogramas referentes à análise de ZO e suas impurezas em diferentes concentrações. ACP **(1)**: 300 ng mL^{-1}, N-Ox **(2 e 3)**: 300 ng mL^{-1}, RP29307 **(4)**: 600 ng mL^{-1} e **(5 e 6)** ZO: 300 ug mL^{-1}. Coluna CHIRALPAK AD-RH, fase móvel constituída por metanol:etanol:ACN (60:35:5, v/v/v) + 0,3% DEA, vazão de 0,6 mL min^{-1}, detecção em 305 nm. **(B)** expansão do cromatograma **(A).**

Para a solução do problema, foi necessário empregar uma técnica alternativa e com maior poder de resolução, a CE.

5.4.2 Análise por CE-UV

5.4.2.1 Separação quiral

A separação dos enantiômeros por CE é baseada, principalmente, no emprego de seletores quirais presentes na solução de eletrólitos. Essa separação se dá devido à interação diferencial de cada enantiômero com o seletor quiral, fazendo que os enantiômeros apresentem tempos de migração diferentes. Assim, a determinação do melhor tipo de seletor quiral e a concentração que este deve ser utilizado é fundamental no desenvolvimento de um método por CE. Outros fatores importantes para a separação dos analitos são: concentração do tampão, pH do tampão, tensão aplicada no capilar, temperatura aplicada no capilar e o comprimento do capilar.

5.4.2.1.1 Efeito do pH e concentração da solução tampão

O pH da solução de eletrólitos é um fator importante que afeta a carga dos solutos ionizáveis (analitos e seletor quiral) e também o fluxo eletrosmótico (EOF) (ALTRIA, 1996). Para avaliar a influência do pH da solução de eletrólitos na separação dos enantiômeros dos analitos estudados, foram utilizadas soluções fosfato de sódio na concentração de 50 mmol L^{-1} nos pHs 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 5,5, 6,0 e 7,0 e tampão borato de sódio 50 mmol L^{-1} nos pHs 9,0, 9,3, 9,5 e 10. A β-ciclodextrina nativa foi escolhida para este estudo inicial uma vez que esta é amplamente empregada em separações quirais descritas na literatura e por já ter

sido empregada na separação quiral da ZO e metabólitos por Hempel e Blaschke, (1996).

Os analitos de interesse apresentam caráter básico, assim, estão ionizados em meio ácido, enquanto que a CD neutra não apresentam carga em nenhum valor de pH. Em pHs baixos, o EOF é reduzido, uma vez que os grupos silanóis da parede interna do capilar estão na sua grande parte não ionizados (ALTRIA, 1996). Em contrapartida, os analitos alcançam o detector (eletrodo negativo) devido à carga positiva que eles adquirem. Valores maiores de pH (faixa alcalina) resultam na diminuição da mobilidade eletroforética dos analitos e eles passam a migrar por causa do aumento do EOF. A **Figura 5.8** mostra que a resolução dos enantiômeros diminui a medida em que o pH é aumentado. O pH que conferiu os melhores resultados para a separação dos analitos foi o pH 2,5. Nessas condições a impureza aquiral ACP é completamente separada dos demais compostos (tempo de migração de 2,8) enquanto que a ZO não migrou em 5,6 minutos.

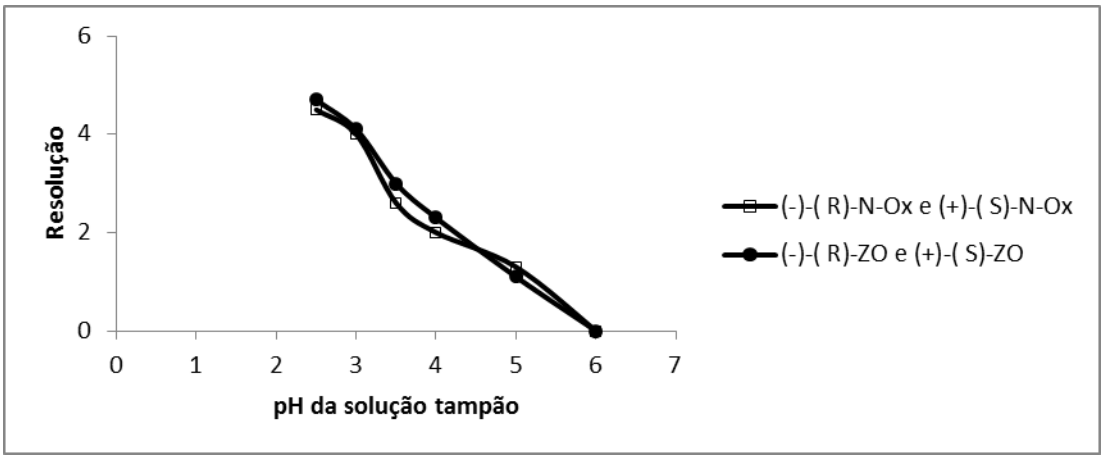


Figura 5.8. Influência do pH da solução tampão na separação dos enantiômeros da ZO e da N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} contendo 20 mmol L^{-1} de β-CD, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC.

A concentração do tampão fosfato de sódio e do tampão borato de sódio foi avaliada no intervalo de 50-100 mmol L^{-1}. O aumento da concentração leva a uma diminuição do EOF e, em muitos casos, pode ocasionar uma melhora na resolução. A diminuição do EOF pelo aumento da concentração da solução é resultante da compressão da dupla camada da parede interna do capilar e diminuição do potencial zeta (Baker 1995). Em contrapartida, o aumento excessivo da concentração do tampão pode ocasionar o efeito Joule, levando a um aquecimento da solução de eletrólitos, o que resulta na perda de resolução (TAVARES, 1997). Neste estudo, a separação completa dos analitos foi obtida com o tampão fosfato de sódio, pH 2,5, na concentração de 50 mmol L^{-1}. Entretanto, o emprego desse mesmo tampão na concentração de 80 mmol L^{-1} forneceu picos mais simétricos e em tempos de migração satisfatórios. Concentrações acima desse valor prejudicaram a resolução dos enantiômeros (**Figura 5.9**). Assim, a concentração da solução de eletrólitos foi definida em 80 mmol L^{-1}. Nessas condições a impureza aquiral ACP é completamente separada dos demais compostos (tempo de migração de 2,8 minutos enquanto que a ZO não migrou em 5,6 minutos).

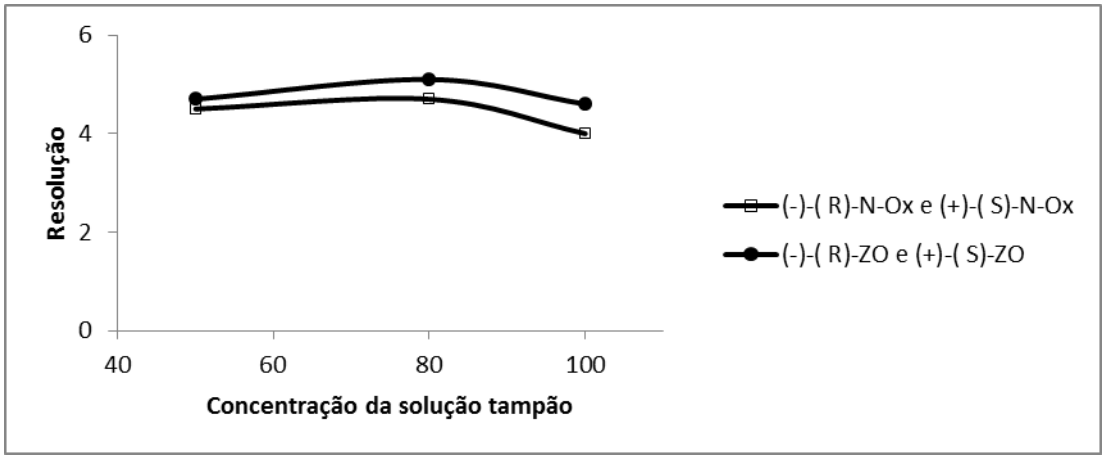


Figura 5.9 Influência da concentração da solução tampão na separação dos enantiômeros da ZO e da N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio pH 2,5 contendo 20 mmol L^{-1} de β-CD, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC.

5.4.2.1.2 Avaliação dos seletores quirais

Para avaliação da influência do seletor quiral na resolução dos enantiômeros da ZO e de suas impurezas, foram empregados os seguintes seletores quirais: β-CD, HP-β-CD, DM-β-CD, TM-β-CD, CM-β-CD e S-β-CD.

As CDs e seus derivados são amplamente descritas na literatura para separações quirais. Sua estrutura, em formato de cone truncado, com cavidade hidrofóbica e boca da cavidade hidrofílica, permite a inclusão dos analitos na cavidade e interação de grupos específicos do analito com os grupos hidrofílicos da parte externa, levando a resolução dos enantiômeros (FANALI 2000).

A resolução dos enantiômeros da ZO e da N-Ox foi obtida com a β-CD e com a CM-β-CD. As demais CDs não propiciaram a resolução eficiente dos analitos nas condições empregadas. Como a CM-β-CD propiciou melhor resolução dos analitos, essa foi selecionada como seletor quiral do método (**Figura 5.10**).

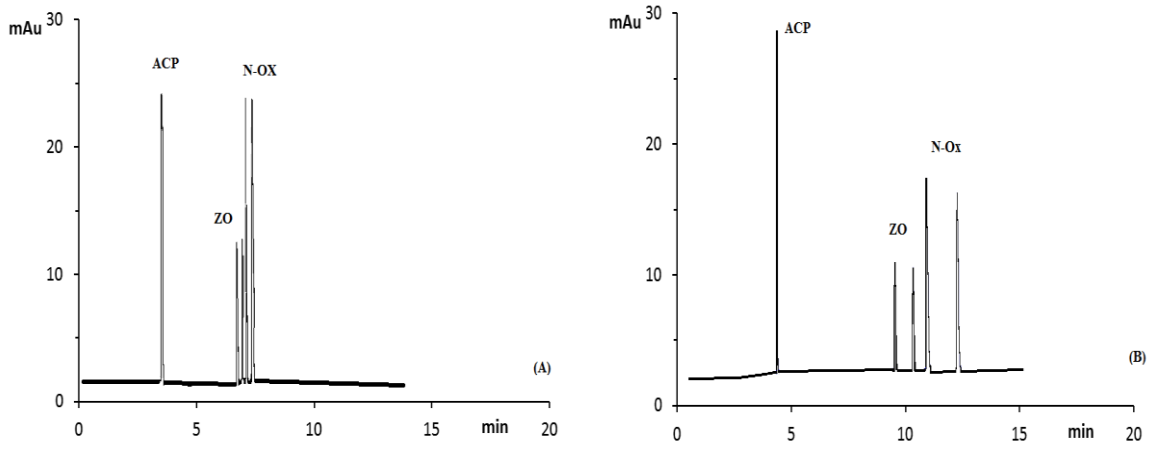


Figura 5.10 Eletroferogramas mostrando a separação da ZO, N-Ox e ACP. Solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 2,5, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC. (A) β-CD 20 mmol L^{-1}, (B) CM-β-CD 20 mmol L^{-1}.

A concentração de CD também foi avaliada, uma vez que para cada separação existe uma concentração ótima na qual a resolução obtida é máxima. O efeito da concentração da CM-β-CD na resolução dos enantiômeros da ZO e de suas impurezas foi avaliada no intervalo de 5 a 20 mmol L^{-1}. Com a concentração de 5 mmol L^{-1} já foi possível obter excelente resolução dos analitos de interesse e essa concentração foi escolhida por questões de economia do seletor quiral.

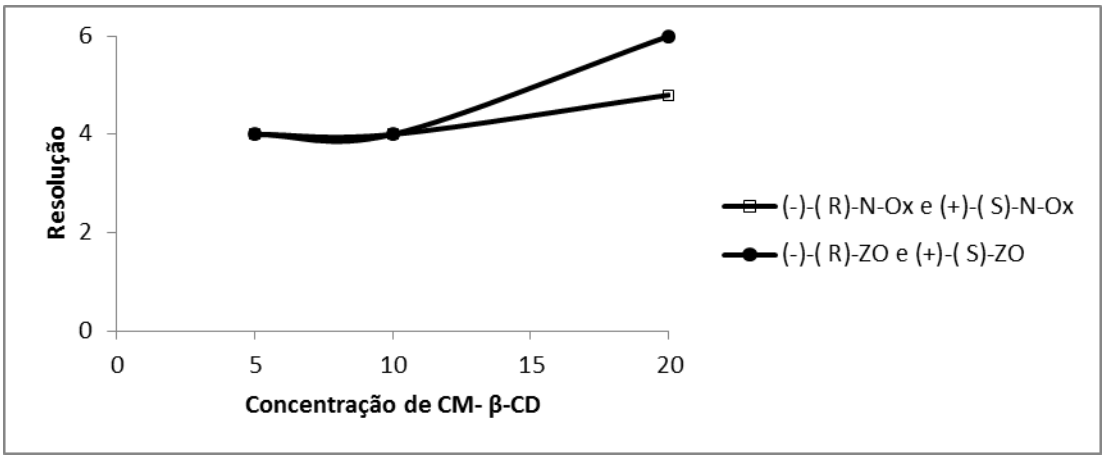


Figura 5.11 Influência da concentração de CM-β-CD na separação dos enantiômeros da ZO e da N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1}, pH 2,5, tensão de 25 kV, temperatura de 25 ºC.

5.4.2.1.3 Temperatura e tensão

O aumento na tensão do sistema aumenta a velocidade eletroforética, porém esta não pode ser aumentada infinitamente uma vez que a geração de correntes superiores a 100 µA é prejudicial à separação. Assim, o efeito da tensão na resolução quiral da ZO e suas impurezas foi avaliada no intervalo de 20-30 kV.

Pela **Tabela 5.2** é possível observar que com 30 kV, o tempo de migração do ultimo analito é menor porém, nessa condição, a corrente gerada foi próxima ao valor de 100 µA. Desta forma a tensão foi definida em 27 kV, o que resultou em tempos de migração adequados e corrente inferior a 100 µA.

Tabela 5.2 Influência da tensão

Tensão **aplicada (kv)**	**Tempo de migração do último analito (min)**
22	8,0
25	7,7
27	7,1
30	6,8

A temperatura influencia a viscosidade do sistema, influenciando assim o EOF e, consequentemente, a mobilidade eletroforética (ALTRIA, 1996). Em baixas temperaturas, a cinética de transferência de massas entre o complexo analito/CD é afetada ocasionando, em geral, uma melhora na resolução e um aumento do tempo de migração (SERVAIS; CROMMEN; FILLET, 2010). O efeito da temperatura foi avaliado no intervalo de 23 – 28 ºC. A temperatura escolhida para o método foi 25 ^{O}C (**Figura 5.12**)

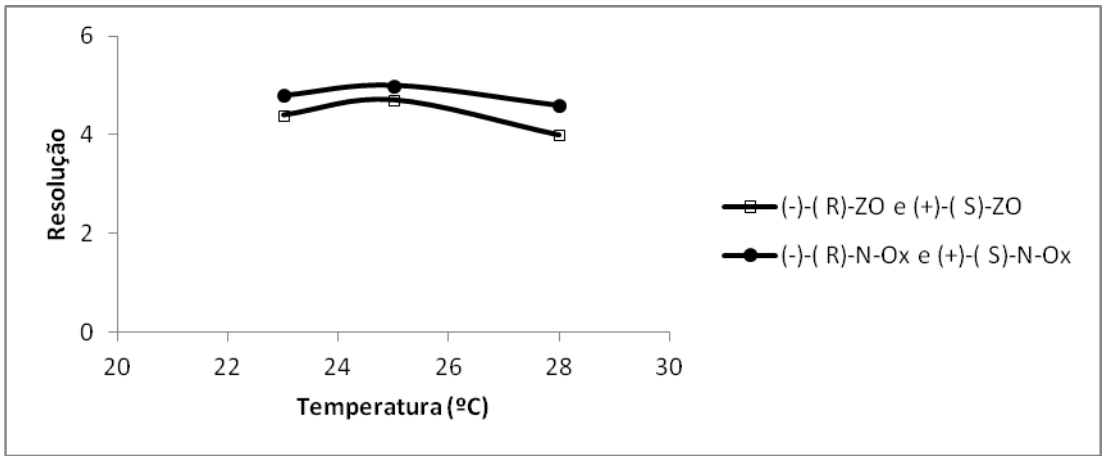


Figura 5.12 Influência da temperatura na separação dos enantiômeros da ZO e da N-Ox. Condições de análise: Solução tampão fosfato de sódio 80 mmol L^{-1}, pH 2,5, contendo 5 mmol L^{-1} de CM-β-CD, tensão de 27 kV, .

5.4.2.1.4 Condições definidas para análise por CE-UV

No início da otimização do método, pretendia-se obter a resolução simultânea da ACP (impureza não quiral) e dos enantiômeros da ZO, N-Ox e RP29307. No entanto, como indicado na literatura, a resolução quiral simultânea da ZO e todas as suas impurezas é muito difícil devido às diferenças nas polaridades das impurezas (BOURINE et al., 1994). Sendo assim, não foi possível validar um método capaz de quantificar todos os analitos simultaneamente.

Portanto, a resolução da ZO e as impurezas ACP e N-Ox foi priorizada. Nessa etapa, diversos outros fármacos foram avaliados para seleção de um padrão interno adequado e dentre eles, a trimetropina foi selecionada.

A resolução foi obtida em um capilar de sílica fundida (50 µm, 42 cm de comprimento efetivo, 50 cm de comprimento total), utilizando tampão fosfato de sódio 80 mmol L^{-1}, pH 2,5 contendo 5 mmol L^{-1} de CM-β-CD. A detecção foi feita por UV em 305 nm para ZO e suas impurezas e 200 nm para o IS. A tensão aplicada foi otimizada em 27 kV e a temperatura do capilar foi de 25 ºC. Foi utilizado o modo de polaridade normal. Devido a baixa solubilidade da ZO em água, as amostras foram dissolvidas em água: ACN (9:1, v/v). A injeção dos analitos foi realizada por injeção hidrodinâmica (55 mbar, 30 s). A **Figura 5.13** mostra o eletroferograma da ZO e suas impurezas nas condições descritas acima.

Como indicado na introdução deste capítulo, até o presente momento não há métodos na literatura para a análise enantiosseletiva da ZO e suas impurezas ACP e N-OX por CE. Os métodos descritos permitem separar apenas os enantiômeros da ZO (ASENSI-BERNARDI et al. 2011), ZO e seus metabólitos (HEMPEL e BLASCHKE, 1996), e ZO e seu precursor sintético (GOMIS, 2009).

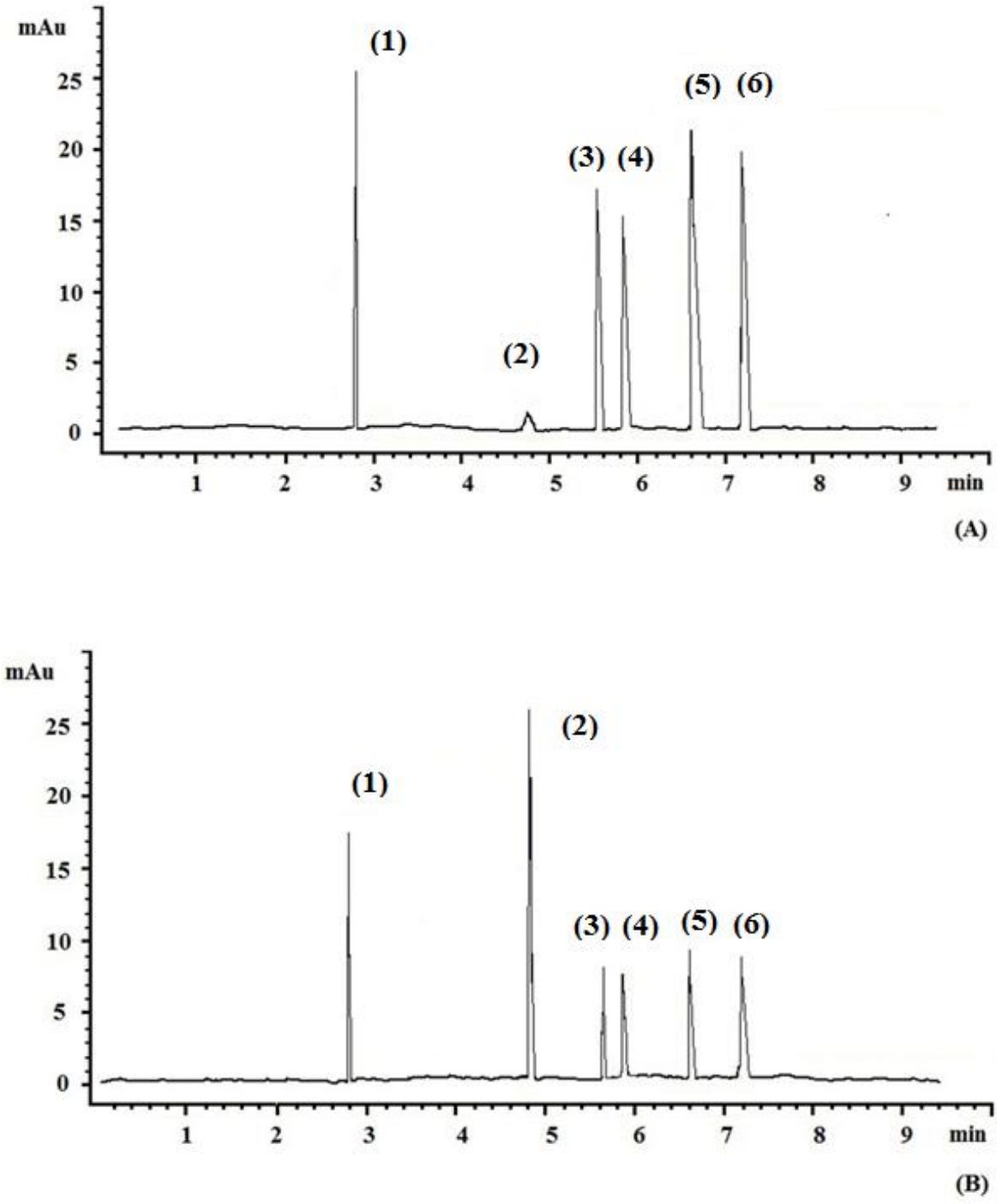


Figura 5.13. Eletroferogramas referentes à análise da ZO e suas impurezas. ACP (1), TRI - IS (2), (-)-(R)-ZO (3), (+)-(S)-ZO (4), (-) - (R)-N-Ox (5), e (+)-(S)-N-Ox (6) nas concentrações de 50 µg mL^{-1} de cada enantiômero da ZO e N-Ox, 100 µg mL^{-1} para ACP e 20 µg mL^{-1} para o TRI. (A) 305 nm, (B) 200 nm.

Utilizando-se da mesma solução de eletrólitos, várias injeções foram feitas para determinar quantas análises poderiam ser feitas com o mesmo eletrólito. Para garantir a repetibilidade dos tempos de migração, bem como para evitar a eletrólise do tampão de análise, o reservatório do tampão de análise foi substituído após dez análises consecutivas.

A ordem de migração dos enantiômeros do ZO e N-Ox (ACP não é quiral) foram determinadas com base no método relatado anteriormente no capítulo 3, item 3.3.2.3. Os enantiômeros após análise por HPLC quiral foram coletados separadamente, a fase móvel foi evaporada a secura sob fluxo de ar comprimido, os resíduos foram dissolvidos em 100 µL de água:ACN (9:1, v/v). Depois disso, os enantiômeros separados foram analisados nas condições eletroforéticas aqui descritas. A ordem de migração obtida neste método foi ACP, (-)-(R)-ZO, (+)-(S)-ZO, (-)-(R)-N-Ox e (+)-(S)-N-Ox.

5.4.2.2 Validação analítica do método desenvolvido

Em acordo com as diretrizes recomendadas para validação analítica de métodos empregados para a determinação do principio ativo e impurezas em matérias primas e formulações (ANVISA, 2003), os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez foram avaliados.

5.4.2.2.1 Seletividade

O parâmetro seletividade corrobora que independente da existência de outras substâncias, o método é capaz de diferenciar e quantificar o analito de interesse (FDA, 2001). O método provou ser adequado para análise dos enantiômeros da ZO, sem interferência de suas impurezas ou produtos de degradação, incluindo a impureza 29307 que tem um tempo de migração maior do que o tempo de análise total. O teste de pureza dos picos da ZO, após testes de degradação, mostrou que não houve co-eluição de picos que poderiam prejudicar a análise da ZO uma vez que os valores de fator de pureza obtidos foram superiores ao limiar especificado (*Threshold*) em cada estudo para cada enantiômero.

Tabela 5.3 Pureza de pico da ZO em cada teste de degradação

Testes de degradação	**(-)-(R)-ZO Fator de pureza**	***Threshold***	**(+)-(S)-ZO Fator de pureza**	***Threshold***
Hidrólise básica	880,2	763,9	870,3	741,9
Hidrólise ácida	989,9	980,3	937,5	907,4
Oxidação H_2O_2 3%	957,2	916,5	936,7	886,5
Luz 245 nm	856,1	678,0	875,4	691,2

5.4.2.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi estabelecida relacionando a razão das áreas dos picos (enantiômero da ZO ou impureza / IS) *versus* as concentrações teóricas conhecidas de cada enantiômero. A análise da regressão linear das curvas analíticas resultou em equações lineares conforme demonstrado na **Tabela 5.4.**

Tabela 5.4 Linearidade do método.

Analitos	Linearidade			ANOVA	
	Intervalo	Equação da reta	Coeficiente de correlação	Valor de (*F*)	Valor de ($F_{crítico}$)
(-)-(R)-ZO	0,4-0,8 mg mL^{-1}	y = 4,3643x +1,5122	0,9906	100	1,99
(+)-(S)-ZO	0,4-0,8 mg mL^{-1}	y = 4,4717x +1,609	0,9908	121	1,99
(-)-(R)-N-Ox	0,4-0,8 µg mL^{-1}	y = 0,032x – 0,0078	0,9907	109	1,99
(+)-(S)-N-Ox	0,4-0,8 µg mL^{-1}	y = 0,0376x -0,0135	0,9914	132	1,99
ACP	0,8-1,6 µg mL^{-1}	y= 0,2428x - 0,16	0,9920	108	1,99

5.4.2.2.3 Precisão e exatidão

Os resultados obtidos na avaliação da precisão intraensaio e interensaios e da exatidão do método resultaram em CV e erros relativos dentro da faixa aceitável (inferiores a 2%) (**Tabela 5.5**).

5.4.2.2.4 Limite de detecção e de quantificação

Nas condições descritas, o LOQ foi de 0,8 µg mL^{-1} para o ACP e 0,4 µg mL^{-1} para cada enantiômero da N-Ox. Os limites de detecção foram 0,01 µg mL^{-1} para o ACP e de 0,002 µg mL^{-1} para cada enantiômero da N-Ox (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Precisão, exatidão, LOD e LOQ do método.

Analitos	ACP	(-)-(R)-N-Ox	(+)-(S)-N-Ox	(-)-(R)- ZO	(+)-(S)-ZO
Precisão intraensaio (CV %), (n = 5)[a]	1,8	0,7	1,6	1,0	1,9
Precisão interensaios CV %), (n = 3)[b]	1,2	1,8	1,9	1,6	1,9
Exatidão Erro (%)	0,1	-0,2	-0,6	-1,5	-1,4
LOQ[c] (µg mL^{-1})	0,8	0,4	0,4	-	-
Erro (%)	0,2	-0,5	-0,4		
(CV %)	1,5	0,7	0,8	-	-
LOD (µg mL^{-1})	0,01	0,02	0,02	-	-

a) n = número de amostras
b) n = número de dias
c) Limite de quantificação, *n*=5.

5.4.2.2.5 Robustez

Na avaliação da robustez do método, também foi utilizado o software Minitab, conforme descrito no capítulo 3. Os códigos dos fatores avaliados pelo gráfico de Pareto foram temperatura do capilar (A), tensão aplicada (B), concentração do tampão fosfato de sódio (C), e concentração de CM-β-CD (D). Os resultados obtidos na robustez da ZO mostrados na **Figura 5.14**, comprovam que nenhum dos parâmetros avaliados afetou as respostas do método, provando que o método é robusto. O mesmo resultado foi obtido para as impurezas estudadas, N-Ox e ACP. Os fatores avaliados resultaram em efeitos menores que o $t_{crítico}$ na área ($t_{crítico}$ = 0,5, 0,9 e 0,7 respectivamente para ACP, (-)-(R)-N-Ox e (+)-(S)-N-Ox**),** na resolução ($t_{crítico}$ = 0,3 e 0,5 respectivamente para ACP e N-Ox) e no tempo de migração ($t_{crítico}$ = 1,0 e 1,2 respectivamente para ACP e N-Ox) estudado.

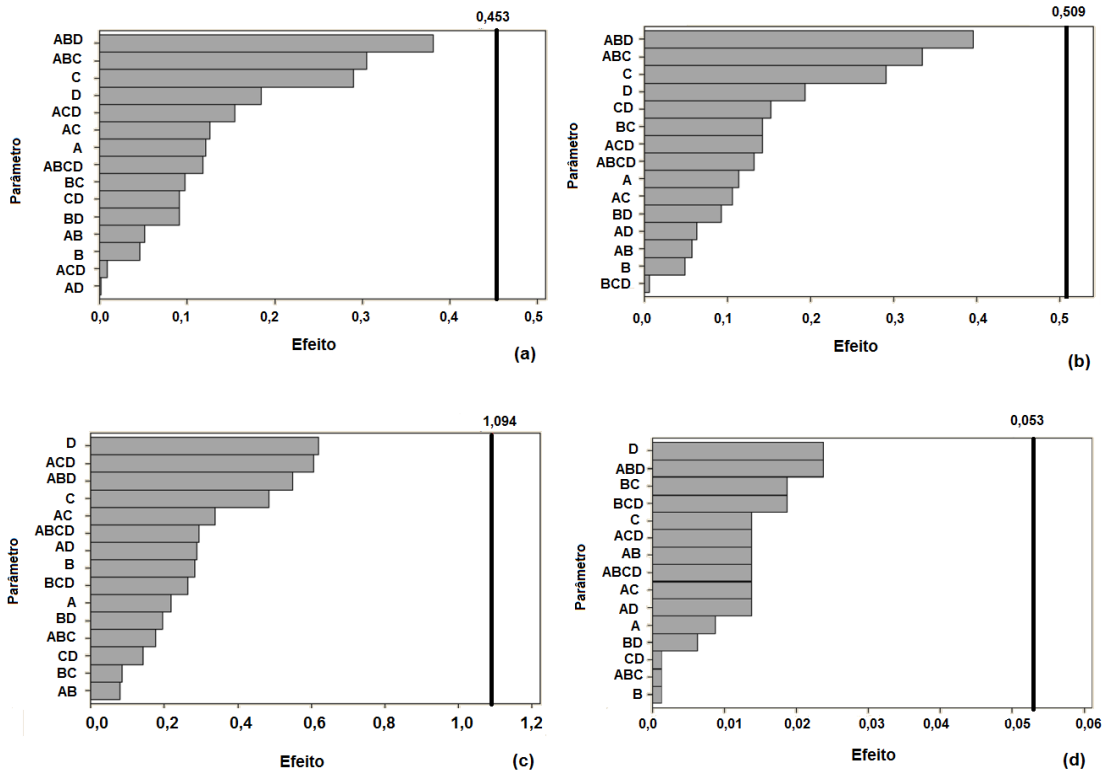


Figura 5.14 Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis e suas interações na (a) área da (-)-(R)-ZO, (b) área da (+)-(S)-ZO, (c) tempo de migração da ZO e (d) resolução dos enantiômeros da ZO. A linha vertical representa o valor de t-crítico.

5.4.2.3 Aplicação do método validado

O método foi aplicado na análise dos enantiômeros da ZO em comprimidos revestidos disponíveis comercialmente. Os resultados obtidos para os enantiômeros da ZO são consistentes com as especificações da formulação. Os comprimidos preparados na concentração de 1,0 mg mL^{-1} de ZO (0,5 mg mL^{-1} de cada enantiômero) conforme descritos no item 5.3.2.4 foram analisados em triplicata e o teor obtido foi de 0,497 mg mL^{-1} (CV = 0,5 %) para (-)-(R)-ZO e 0,498 mg mL^{-1} (CV = 0,7 %) para (+)-(S)-ZO. Além disso, nenhuma impureza pode ser detectada nas condições utilizadas.

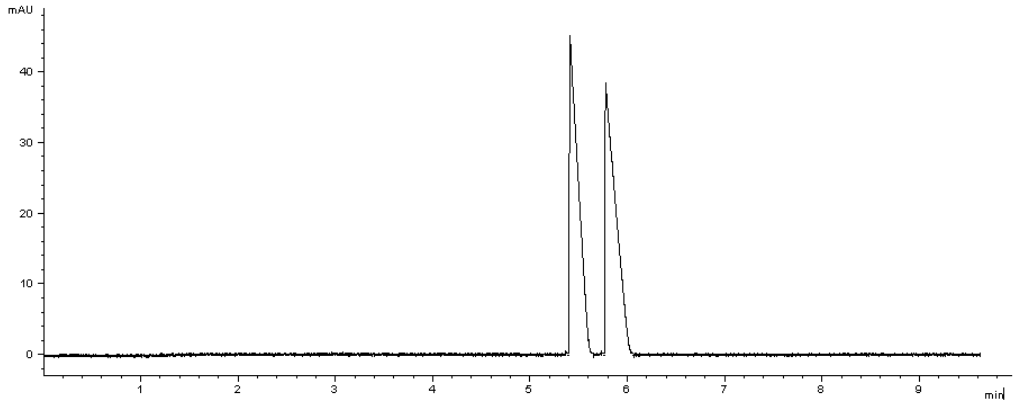


Figura 5.15 Eletroferograma referente à análise da ZO em comprimidos.

O método validado também foi usado para determinar a degradação e racemização da ZO em condições de estresse. Para isso a mistura racêmica do fármaco e os enantiômeros isolados foram submetidos a condições de estresse e depois analisados.

Os experimentos de hidrólise ácida e hidrólise alcalina da ZO mostraram a formação da impureza ACP. Durante os tempos avaliados (0, 30, 60 e 120 min), foi possível observar uma diminuição nas concentrações dos enantiômeros da ZO e um aumento nas concentrações da impureza ACP. Quando os enantiômeros isolados da ZO foram estudados, ambos formaram a impureza ACP. A degradação foi igual para ambos os enantiômeros. A racemização não foi observada. Nesses estudos, observou-se também que a degradação da ZO e formação de ACP foram mais rápidas em condições de hidrólise básica se comparado à hidrólise ácida (Figura 5.16).

A degradação por oxidação foi realizada com H_2O_2 3% e o estudo da fotodegradação com luz de 245 nm. Ambos os experimentos resultaram na formação das impurezas ACP e N-Ox. Quando os enantiômeros isolados da ZO foram submetidos a essas condições, a formação das impurezas (+)-(S)-N-Ox e ACP foi observada na degradação da (+)-(S)-ZO, enquanto que (-)-(R)-N-Ox e o ACP foram formados na degradação da (-)-(R)-ZO. A degradação ocorreu da mesma forma para os dois enantiômeros. A racemização não foi observada nestes estudos.

A impureza 29307 não foi observada nesses experimentos porque o seu tempo de migração nas condições utilizadas foi maior do que o tempo de análise total. Nos experimentos realizados para avaliar a estabilidade em condições oxidativas, um pico desconhecido foi observado (Figura 5.16). Este pico pode estar relacionado com impureza RP 48497 que não foi estudada neste método devido à impossibilidade de obtenção do padrão analítico. Utilizando infusão direta dessa amostra na fonte de ionização por eletronebulização de um espectômetro de massas foi possível confirmar que esse pico corresponde a impureza RP 4849

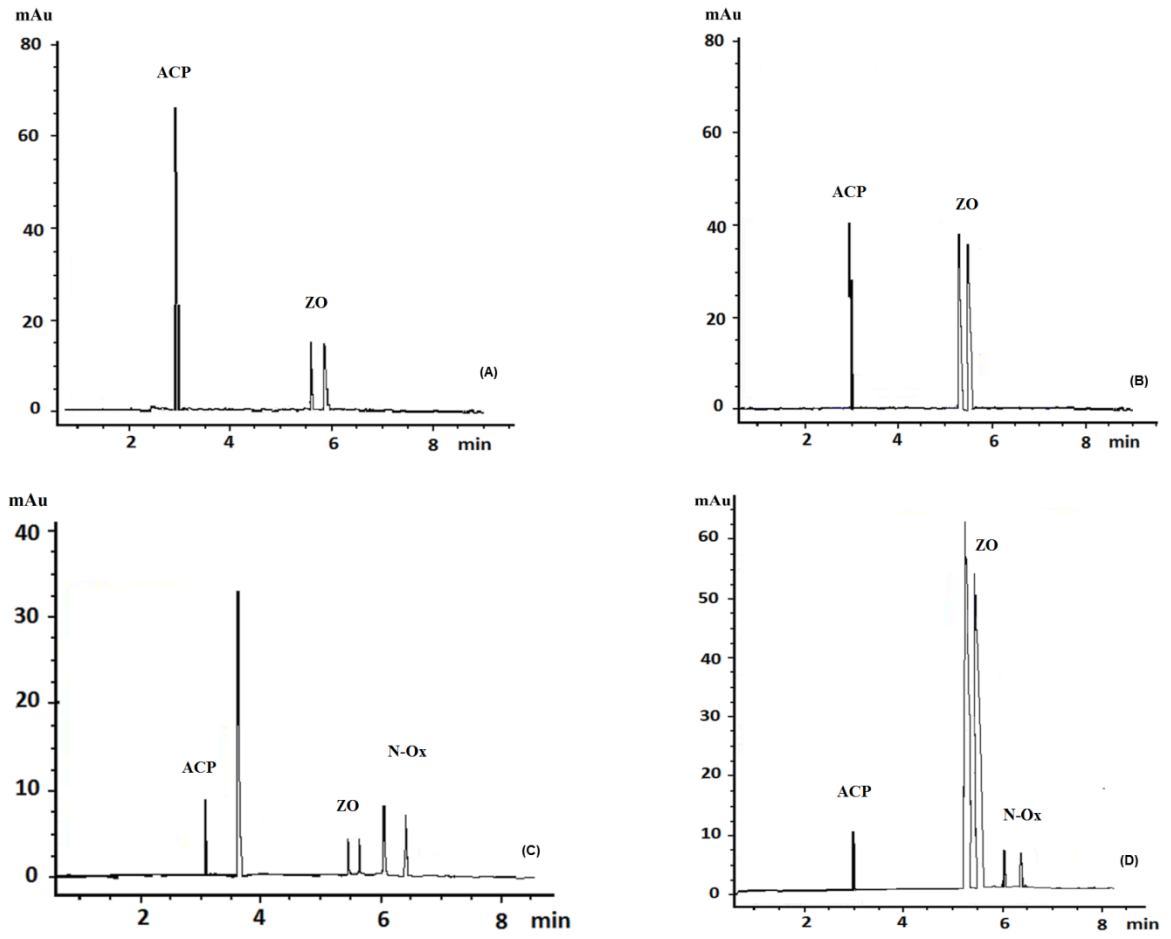


Figura 5.16 Eletroferogramas referentes a análise das amostras de ZO submetidas à hidrólise alcalina (A), hidrólise ácida (B), reação de oxidação (C) e fotodegradação (D). Tempo de exposição: 120 minutos para cada condição de estudo.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, as técnicas LC-MS-MS, LC-UV e CE foram empregadas na determinação estereosseletiva da ZO, seus metabólitos e suas impurezas em plasma e cérebro de ratos e em formulações farmacêuticas. Os métodos desenvolvidos e validados empregando LC-MS-MS foram aplicados em um estudo de disposição cinética da ZO em plasma e em cérebro de ratos. O método desenvolvido para a análise da ZO e suas impurezas por CE foi aplicado na análise dos enantiômeros da ZO em comprimidos revestidos disponíveis comercialmente e na determinação da degradação e racemização desse fármaco em condições de estresse. Estas técnicas analíticas forneceram métodos com suficiente resolução, seletividade, precisão, exatidão e detectabilidade para a determinação da ZO, seus metabólitos e impurezas para a finalidade pretendida.

As principais vantagens da técnica LC-MS-MS, empregada no desenvolvimento dos métodos de análise da ZO em matrizes biológicas, são a alta seletividade e detectabilidade, possibilitando obter limites de quantificação de 7,5 ng de cada enantiômero (ZO e metabólitos) por mL de plasma e 2,9 ng de cada enantiômero da ZO por g de cérebro. Pela primeira vez, a técnica LC-MS-MS foi empregada para a análise estereosseletiva da ZO e seus metabólitos em matrizes biológicas. Ao comparar o método desenvolvido para análise da ZO e seus metabóltios em plasma com os outros descritos na literatura, pode-se observar semelhanças no limite de quantificação, no entanto, este novo método apresenta as vantagens de uma maior seletividade, devido à utilização de detecção MS-MS, menor tempo de análise e simplicidade, devido à utilização de apenas uma coluna cromatográfica. O método LC-MS-MS para a análise estereosseletiva da ZO em cérebro de ratos forneceu menor limite de quantificação que o descrito na literatura, além de maior seletividade e menor tempo de análise.

Esses métodos desenvolvidos foram empregados em estudos piloto de disposição cinética da ZO em plasma e em cérebro de ratos. Ambos os estudos evidenciaram a estereosseletividade na farmacocinética desse fármaco, em acordo com dados da literatura.

A CE mostrou-se particularmente interessante devido ao baixo custo do método, rapidez e grande poder de resolução, conseqüência da alta eficiência e simetria dos picos. Esta técnica destaca-se também por sua complementariedade em relação aos métodos cromatográficos estereosseletivos, já que somente a CE quiral mostrou resolução adequada entre os picos da ZO e de suas impurezas para permitir a determinação simultânea desses compostos, nos intervalos de concentração necessários (concentração das impurezas 1000 vezes menores que do fármaco). Infelizmente, devido às diferentes características das impurezas da ZO e dificuldades em obter padrões de uma delas, apenas a ACP e N-Ox puderam ser determinadas. Essa técnica também foi empregada pela primeira vez para a análise da ZO e de suas impurezas.

O estudo de degradação do racemato e dos enantiômeros isolados da ZO mostrou que eles foram degradados o suficiente para ser detectada uma diminuição na concentração do fármaco e consequente aparecimento das impurezas, mas a racemização não foi observada em nehuma das condições estudas. Além disso, ambos os enantiômeros apresentaram o mesmo perfil de degradação.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. **Nature Reviews Drug Discovery,** London, v.1, p.753-768, 2002.

AGRANAT, I.; WAINSCHTEIN, S. R. The strategy of enantiomer patents of drugs. **Drug Discovery Today**, Oxford, v.15 (5/6), p.163-170, 2010.

ALTRIA, K.D. Fundamentals of capillary electrophoresis theory. In: _____. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications**. Totowa: Humana Press Inc., 1996. Cap.1, p.3-13.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a realização de estudos de estabilidade RDC Nº1**, de 29 de julho de 2005, Brasília, DF, 2005.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE. Nº. 899,** de 29 de maio de 2003, Brasília, DF, 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm Acesso em 6 de fevereiro de 2012.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos RDC Nº 16,** de 2 de março de 2007, Brasília, DF, 2007. Disponível em http://www.sivs.org/images/stories/RDC_16_de_2007.pdf. Acesso em 10 de fevereiro de 2012.

ASENSI-BERNARDI, L.; MARTÍN-BIOSCA, Y.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M. J.; SAGRADO, S. On the zopiclone enantioselective binding to human albumin and plasma proteins. An electrokinetic chromatography approach **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v.1218, p.3111–3117, 2011.

BADAWI, N.; SIMONSEN, K. W.; STEENTOFT, A.; BERNHOFT, I. M.; LINNET, K. Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC MS/MS. **Clinical Chemistry,** Washington, v.55(11), p.2004–2018, 2009.

BECQUEMONT, L.; MOUAJJAH, S.; ESCAFFRE, O.; BEAUNE, P.; FUNCK-BRENTANO, C.; JAILLON, P. Cytochrome P-450 3A4 and 2C8 are involved in zopiclone metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v.27(9), p.1068-1073, 1999.

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

BLOOM, F. E. Neurotransmissão e o Sistema Nervoso Central. In:____. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.** 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2004. cap.12, p.223-244.

BONATO, P.S. Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. **Electrophoresis**, Malden, v.24, p.4078-4094, 2003.

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

BOURINE, J. P.; TARDIF, B.; BELTRAN, P.; MAZZO, D .J. High-performance liquid chromatographic stability-indicating determination of zopiclone in tablets. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.677, p.87-93, 1994.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v.32 (4), p.1021-1030, 2009.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quimica Nova**, São Paulo, v.31 (3), p.623-636, 2008.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; CALLEGARI, J. L.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Quimica Nova**, São Paulo, v.29 (2), p.287-292, 2006.

CURRY, D. T.; EISENSTEIN, R. D.; WALSH, J. K. Pharmacologic management of insomnia: past, present, and future. **Psychiatric Clinics,** Philadelphia, v.29, p.871–893, 2006.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações

na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.31, p.627-644, 2008.

DE SANTANA, F. J. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; DA FONSECA, P.; BARTH, T.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Analytical tools for the enantioselective analysis of drugs and metabolites. In: LOPES, N. P.; GUARATINI, T. **Analytical Chemistry for Pharmaceutical and Medical Sciences**. Kerala: Transworld Research Network, 2009. Capítulo 2, p.19-49.

ERNY, G. L.; CIFUENTES, A. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.40, p.509-515, 2006.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6th edition, Council of Europe, Strasbourg: EDQM, 2008.

FANALI, S. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.875, n. 1-2, p.89-122, 2000.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001.

FERNANDEZ, C.; ALET, P.; DAVRINCHE, C.; ADRIEN, J.; THUILLIER, A.; FARINOTTI, R.; GIMENEZ, F. Stereoselective distribution and stereoconversion of zopiclone enantiomers in plasma and brain tissues in rats. **Journal of Pharmacy Pharmacology,** Belfast, v.54, p.335-340, 2002.

FERNANDEZ, C.; BAUNE, B.; GIMENEZ, F.; THUILLIER, A.; FARINOTTI, R. Determination of zopiclone enantiomers in plasma by liquid chromatography using a chiral cellulose carbamate column. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.572, p.195-202, 1991.

FERNANDEZ, C.; GIMENEZ, F.; BAUNE, B.; MARADEIX, V.; THUILLIER, A.; FARINOTTI, R. Determination of the enantiomers of zopiclone and two chiral metabolites in urine using an automated coupled achiral-chiral chromatographic system. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.617, p.271-278, 1993.

FERNANDEZ, C.; GIMENEZ, F.; MAYRARGUE, J.; THUILLIER, A.; FARINOTTI, R. Degradation and racemization of zopiclone enantiomers in plasma and partially aqueous solutions.**Chirality**, Hoboken, v.7, p.267-271,1995.

FOSTER, R. T.; CAILLE, G.; NGO, A.; LEMKO, C. H.; KHERANI, R.; PASUTTO, F. M. Stereospecifiv high-performance liquid chromatographic assay of zopiclone in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.658, p.161-166, 1994.

GATES, P.; SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; CAROLLO, C. A.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, N. P. Mass spectrometry ionisation techniques and applications for the analysis of organic compounds. **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**, Kerala, v.37, p.1-18, 2006.

GEBAUER, M. G.; ALDERMAN, C.P. Validation of a high performance liquid chromatographic method for the enantioespecific quantitation of zopiclone in plasma **Biomedical Chromatography**, Malden, v.16, p.241-246, 2002.

GJERDE, H.; ØIESTAD, E. L.; ØIESTAD, A. M. L.; LANGØDEGÅRD, M.; GUSTAVSEN, I.; HJELMELAND, K.; BERNARD, J.; CHRISTOPHERSEN, A. S. Comparison of zopiclone concentrations in oral fluid sampled with intercept® oral specimen collection device and statsure saliva sampler™ and concentrations in blood. **Journal of Analytical Toxicology**, Cary, v.34, p.590-593, 2010.

GOMIS, D. B., VELASCO, B. C., SANCHEZ, I. H., ALVAREZ, M. D. G., Optimization by factorial design of a capillary electrophoresis method for the chiral resolution and determination of zopiclone and its synthesis precursor. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, London, v.32, p.2654–2668, 2009.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M. G. Chiral separation by capillary electromigration techniques. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1204(2), p.140-156, 2008.

GÜBITZ, G.; SCHMID, M.G. Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Malden, v.21, p.4112-4135, 2000.

HADLEY, M.S.; CAMILLERI, P.; HUTT, A.J. Enantiospecific analysis by capillary electrophoresis: applications in drug metabolism and pharmacokinetics. **Electrophoresis**, Malden**,** v.21, p.1953-1976, 2000.

HAGINAKA, J. Pharmaceutical and biomedical applications of enantioseparations using chromatography techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.27, p.357-372, 2002.

HEMPEL G, BLASCHKE G. Enantioselective determination of zopiclone and its metabolites in urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.675, p.139-146, 1996.

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.

ISSAQ, H. J. Thirty-five years of capillary electrophoresis: advances and perspectives. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, London, v.25, p.1153-1170, 2002.

JANNUZZI, A. H. L.; VASCONCELLOS, A. G.; de SOUZA, C. G. Especificidades do patenteamento no setor farmacêutico: modalidades e aspectos da proteção intelectual. **Caderno de Saúde Pública**, São Paulo, v.24(6), p.1205-1218, 2008.

KITAGISHI, K. Introduction. In: SHINTANI, H.; POLONSKÝ, J. (Ed.). **Handbook of capillary electrophoresis applications**. London: Blackie Academic and Professional, cap.1, p.1-14, 1996

KNOCHE, B.; BLASCHKE, G. Investigations on the in-vitro racemization of thalidomide by high performance liquid-chromatography. **Jounal of Chromatography A**, Amsterdam, v.66, p.235-240, 1994.

LOURENÇO, T. C.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Fases estacionárias quirais para cromatografia líquida de alta eficiência. **Quimica Nova**, São Paulo, v.33 (10), p.2155-2164, 2010.

MAKAROV, A. Eletrostatic axially harmonic orbital trapping: a high performance technique of mass analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v.921, p.227-236, 2000.

MANNAERT, E.; DAENENS, P..; Semipreparative chiral resolution of zopiclone and N-desmethylzopiclone. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** Amsterdam, v.14, p.1367-1370, 1996.

MISLANOVÁ, C.; HUTTA, M. Role of biological matrices during the analysis of chiral drugs by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.797, p.91-109, 2003.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; PUDAGE, A.; SHRIVASTAV, P. HPLC-ESI-MS/MS validated method for simultaneous quantification of zopiclone and its metabolites, N desmethyl zopiclone and zopiclone-N-oxide in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.864, p.137-148, 2008.

NIH - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH STATE OF THE SCIENCE CONFERENCE STATEMENT. Manifestations and management of chronic insomnia in adults June 13–15, 2005. **Sleep**, v.28(9), p.1049-1057, 2005.

NHS - NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL EXCELLENCE. **Guidance on the use of zaleplon, zolpidem and zopiclone for the short-term management of insomnia**. Londres, 2004. Disponível em http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/TA077 fullguidance.pdf. Acesso em janeiro 2012.

NIROGI, R.V.S.; KANDIKERE, V.N.; MUDIGONDA, K. Quantitation of zopiclone and desmethylzopiclone in human plasma by high-performance liquid chromatography

using fluorescence detection. **Biomedical Chromatography**, Malden, v.20, p.794-799, 2006.

NORDGREN, H. K.; BODIN, K.; BECK, O. Chromatographic screening for zopiclone and metabolites in urine using liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry techniques. **Therapeutic Drug Monitoring,** Philadelphia, v.24, p.410–416, 2002.

NUTT, D.J; STAHL, S.M.; Searching for perfect sleep: the continuing evolution of GABAA receptor modulators as hypnotics. **Journal of Psychopharmacology**, London, v.24(11), p.1601–1612, 2011.

OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; MIURA, S.; HATADA, K.; J. Chiral stationary phases for HPLC: cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) chemically bonded to silica gel. **Journal of Liquid Chromatography,** London, v.10, p.1613-1628, 1987.

OKAMOTO, Y.; YASHIMA, E. Polysaccharide derivatives for chromatographic separation of enantiomers. **Angewandte Chemie International**, Hoboken, v.37, p.1020-1043, 1998.

ORLANDO, R. M.; CARDOSO FILHO, N.; GIL, E.S.; STRINGHETTA, J.P.S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, São Paulo v.4, p.08-14, 2007.

PAW, B.; MISZTA, G. Rapid and simple method for the determination of zopiclone in plasma by HPLC. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, London, v.23(18), p.2873–2882 (2000).

PÈREZ, S.; BACELÓ, D. Applications of LC-MS to quantitation and evaluation of the environmental fate of chiral drugs and their metabolites. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v.27, p.836-846, 2008.

PIPERAKI, S.; PARISI-POULO, M. Enantiomeric separation of zopiclone, its metabolites and products of degradation on B-cyclodextrin bonded phase. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.729, p.19-28, 1996.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova,** São Paulo, v.19(3), p.268-277, 1995.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v.24(1), p.68-76, 2001.

ROYER-MORROT, M.J.; RAMBOURG, M.; JACOB, I.; BAUER, P.; ROYER, R. J. Determination of zopiclone in plasma using column liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.581, p.291-299, 1992.

SCHUTTE-RODIN, S.; BROCH, L.; BUYSSE, D.; DORSEY, C.; SATEIA, M.; Clinical guideline for the evaluation and management of chronic insomnia in adults. **Journal of Clinical Sleep Medicine**, Danvers, v.4(5), p.487-504, 2008

SCIFINDER WEB. Disponível em: http://scifinder.cas.org. Acesso em: 2 fevereiro de 2012.

SERVAIS, A. C.; CROMMEN, J.; FILLET, M. Factors influencing cyclodextrin-mediated chiral separations. In: VAN EECKHAUT, A.; MICHOTTE, Y. (Ed.). **Chiral separations by capillary electrophoresis.** Boca Raton: CRC Press, Cap.4, p.87-107, 2010.

SILVA JUNIOR, I. J.; VEREDAS, V. SANTOS, M. A. G.; SANTANA, C .C. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericas puras ou enriquecidas em larga escala. **Quimica Nova,** São Paulo**,** v.29(5), p.1027-1037, 2006.

SMITH, S. W. Chiral toxicology: It's the same thing...Only different. **Toxicological Sciences,** Cary v.110 (1), p.4-30, 2009.

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

STANLEY, C.; MITCHELL, P.; KAYE, C. M. Simple and sensitive method for monitoring zopiclone in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analyst**, London, v.110,p.83-84, 1985.

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.127-154, 2001.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Quimica Nova**, São Paulo, v.20(1), p.493-511,1997.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; NISHI, H. Separation of enantiomers by capillary electrokinetic techniques. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v.666, p.295-319, 1994.

TORNIO, A.; NEUVONEN, P. J.; BACKMAN, J. T. The CYP2C8 inhibitor gemfibrozil does not increase the plasma concentrations of zopiclone. **European Journal of Clinical Pharmacology,** New York, v.62, p.645-651, 2006.

TRIGGLE, D. J. Stereoselectivity of drug action. **Drug Discovery Today,** Oxford, v.2 (4), p.138-147, 1997.

ZHANG, X.; LIU, L.; ZHANG, X.; MA, K.; RAO, Y.; ZHAO, Q.; LI, F. Analytical methods for brain targeted delivery system in vivo: perspectives on imaging modalities and microdialysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** Amsterdam, v.59, p.1-12, 2012.

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

Yılmaz S. Adsorptive stripping voltammetric determination of zopiclone in tablet dosage forms and human urine. **Colloids and Surfaces B**, Turkey, v.71, p.79–83, 2009.

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

WEINBERGER, R. Capillary Zone Electrophoresis: Basic concepts. In: _____. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2000. Capítulo 2, 25-72.

WESSELL, A. M.; WEART, C. W. Eszopiclone (Lunesta) for treatment of transient and chronic insomnia. **American Family Physician**, Washington, v.71, p.2359-2360, 2005.

WILLE, S. M. R.; LAMBERT, W. E. E. Recent developments in extraction procedures relevanto analytical toxicology **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.388, P.1381-1291, 2007.

ANEXO 1. Protocolo 09.1.1175.53.0 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

1994 2009 USP 75 ANOS

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1175.53.0), intitulado "Avaliação de Diferentes Técnicas Analíticas na Análise Enantiosseletiva da Zopiclona, suas Impurezas e Metabólitos em Formulações Farmacêuticas e Plasma", de autoria de **Milena Araújo Tonon** e de **Pierina Sueli Bonato** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 09/12/2009.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.1175.53.0), entitled: "Avaliação de Diferentes Técnicas Anaçíticas na Análise Enantiosseletiva da Zopiclona, suas Impurezas e Metabólitos em Formulações Farmacêuticas e Plasma", by **Milena Araújo Tonon** and **Pierina Sueli Bonato,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December 09, 2009.

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2009.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964