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.

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.

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)

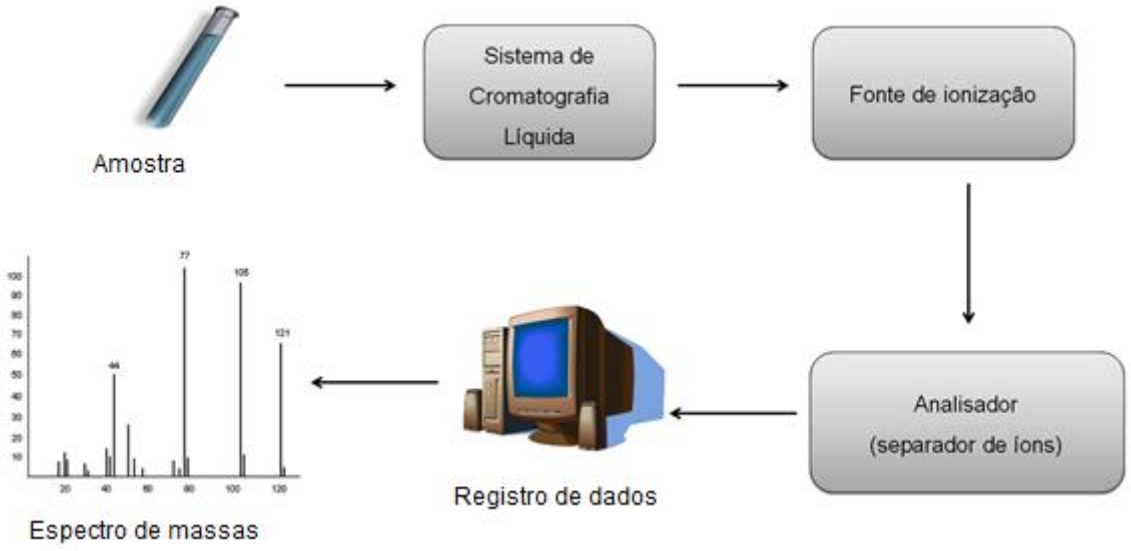


Figura 1.1. Esquema dos componentes básicos da cromatografía líquida aclopada a espectrometria de massas (Adaptado de Gates et al., 2006).

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.

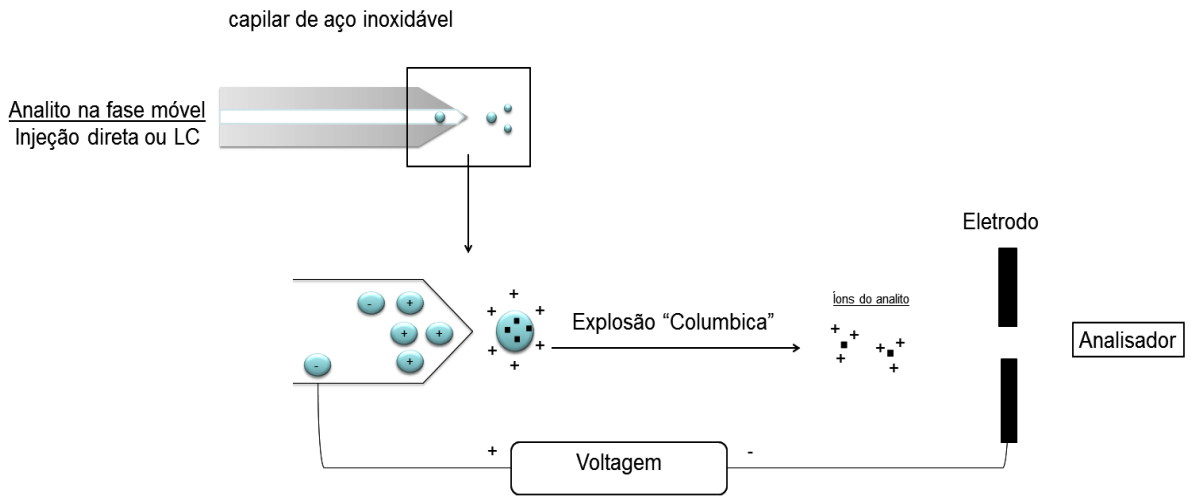


Figura 1.2. Esquema mostrando uma fonte de ionização por eletronebulização (Adaptado de Gates et al., 2006).

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).

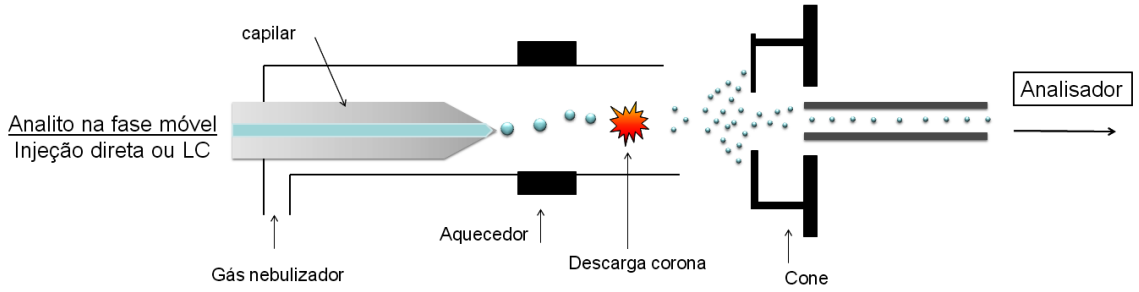


Figura 1.3. Esquema mostrando uma fonte de ionização por APCI (Adaptado de Gates et al., 2006).

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.

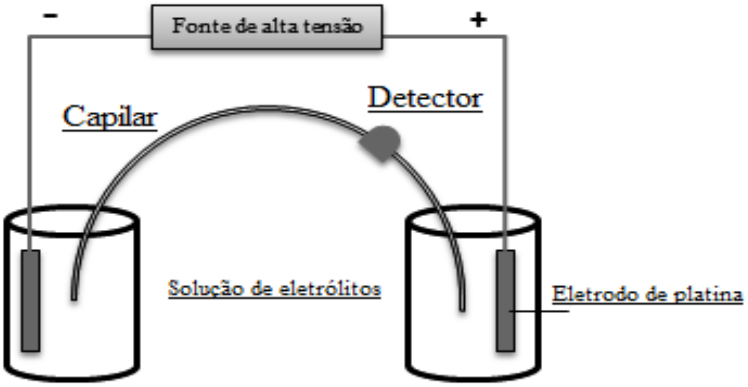


Figura 1.4 Esquema dos componentes básicos de um sistema de eletroforese capilar.

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**).

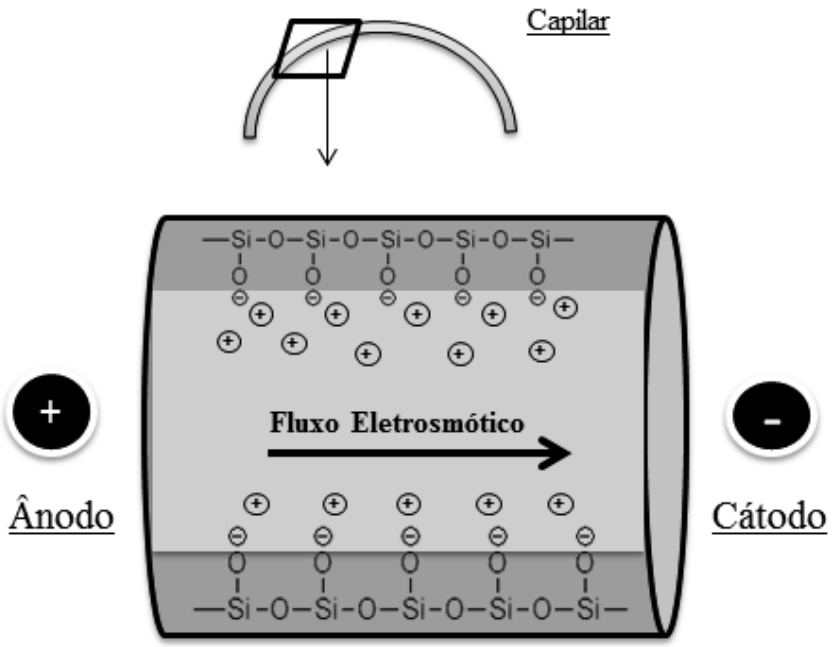


Figura 1.5 Representação do EOF em um capilar de sílica fundida.

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).

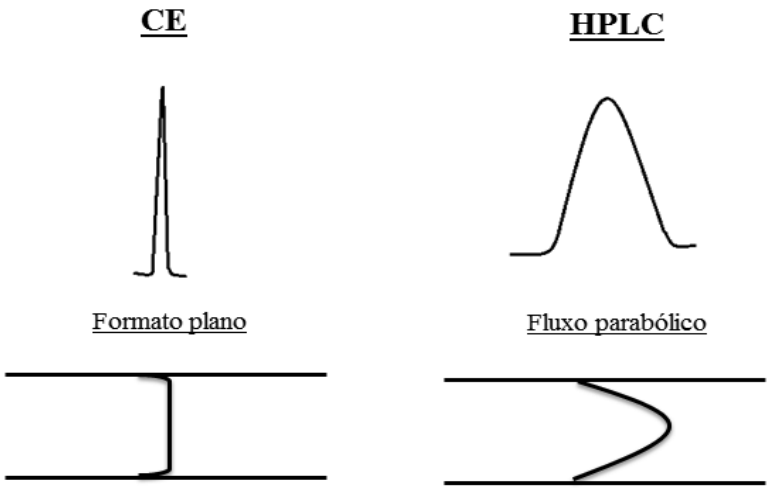


Figura 1.6 Perfil do fluxo eletrosmótico na CE e hidrodinâmico no HPLC (Adaptado de WEINBERGER, 2000).

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).

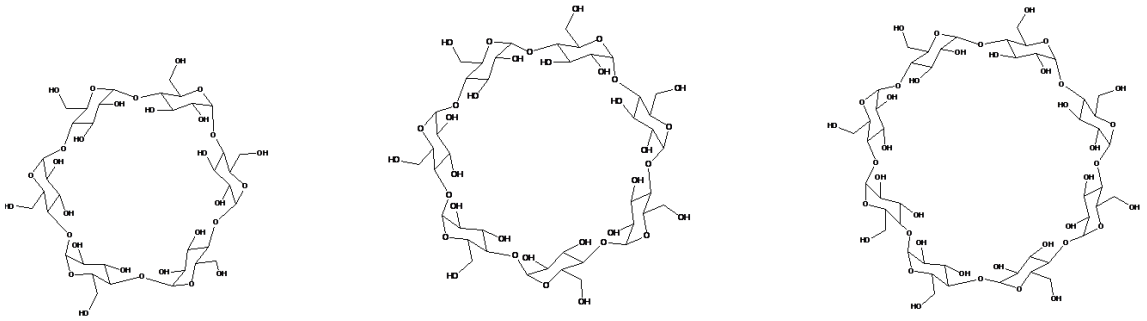
1.2.2.1 Separação de enantiômeros por CE

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).

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.