

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Adriana Corrêa Pereira Oliveira

**Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia
Bioanalítica Para Quantificação de Zolpidem em
Plasma Humano Utilizando a Técnica de
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria
de Massas (LC-MS/MS)**

BRAGANÇA PAULISTA

2010



OLIVEIRA, Adriana Corrêa Pereira. “Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Bioanalítica para Quantificação de Zolpidem em Plasma Humano Utilizando Cromatografia Líquida Acoplada Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em quinze de Abril de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Eduardo César Meurer - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco

Profª. Drª. Silvana Calafatti
Universidade São Francisco

Profª. Drª. Luiz Alberto Beraldo Moraes
Universidade de São Paulo

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1025
CÂMPUS DE CAMPINAS Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

QV 38 Oliveira, Adriana Corrêa Pereira.
O45d Desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de Zolpidem em plasma humano utilizando a técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) / Adriana Corrêa Pereira Oliveira. -- Bragança Paulista, 2010. 51 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Eduardo César Meurer.

1. Zolpidem. 2. Espectrometria de massas - Metodologia.
3. Bioanalítica. I. Meurer, Eduardo César. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

ADRIANA CORRÊA PEREIRA OLIVEIRA

**Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia
Bioanalítica Para Quantificação de Zolpidem em
Plasma Humano Utilizando a Técnica de
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de
Massas (LC-MS/MS)**

BRAGANÇA PAULISTA

2010

ADRIANA CORRÊA PEREIRA OLIVEIRA

**Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia
Bioanalítica Para Quantificação de Zolpidem em
Plasma Humano Utilizando a Técnica de
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de
Massas (LC-MS/MS)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Farmacologia Clínica e Geral.

Orientador: Eduardo César Meurer

BRAGANÇA PAULISTA

2010

ADRIANA CORRÊA PEREIRA OLIVEIRA

**Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia
Bioanalítica Para Quantificação de Zolpidem em
Plasma Humano Utilizando a Técnica de
Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de
Massas (LC-MS/MS)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Farmacologia Clínica e Geral.

BANCA EXAMINADORA

Eduardo César Meurer

Silvana Calafatti

Luiz Alberto Moraes

DEDICATÓRIA

Dedico com todo carinho, este trabalho a minha mãe Ana Maria que muito me ajudou e também pelo amor, educação e pelo exemplo de vida que me deu

Ao meu esposo Silvio que muito me compreendeu, muito me apoiou, muito me incentivou e principalmente pelo seu companheirismo

A minha filha Ana Carolina, pelo amor, afeto e carinho, gestos que foram essenciais para a realização deste trabalho

As minhas irmãs Débora e Eliege, meus cunhados Eduardo e Nailson e principalmente meus sobrinhos Matheus e Gabriel, que me apoiaram e me ajudaram muito.

AGRADECIMENTO

Desejo manifestar o meu agradecimento, de uma forma muito especial, à Deus pela sua presença em todos os momentos da minha vida, inclusive em todo decorrer deste trabalho.

Ao Professor Doutor Eduardo Cesar Meurer pela orientação científica desta tese, pelos ensinamentos, que muito contribuíram para a minha formação científica, pelo apoio concedido durante a realização deste trabalho e pelas valiosas sugestões, e principalmente pela amizade e incentivo.

Ao Professor Doutor Fabio Alessandro Proença Barros, por toda a disponibilidade e apoio concedido, pela amizade e incentivo.

Aos meus colegas e amigos dos laboratórios Core Pesquisas Clínicas e Unifag, que de uma forma ou outra, deram suas contribuições.

A minha amiga Daiane pela imensa contribuição e amizade.

EPIGRAFE

"Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento." [Dalai Lama]

RESUMO

Uma metodologia bioanalítica, sensível e seletiva, foi desenvolvida e validada através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para quantificação de Zolpidem em plasma humano. A preparação da amostra consistiu na adição de Diazepam como padrão interno (PI), extração líquido-líquido em condições ácidas usando uma mistura de hexano/acetato de etila (1:1; v/v) como solvente extrator; seguida de centrifugação, secagem e ressuspensão da amostra em acetonitrila. Ambos, Zolpidem e seu respectivo padrão interno (PI), foram analisados utilizando uma coluna C18 e uma fase móvel composta de acetonitrila (MeCN):hidróxido de amônio 0,1 M e ácido fórmico 88% (60:40:0,1; v/v/v). Os compostos eluídos foram monitorados utilizando espectrometria de massas via *electrospray* em modo positivo (ESI⁺). As análises foram realizadas por monitoramento de reações múltiplas (MRM) empregando a combinação da molécula e seu fragmento iônico de m/z 308,32 > 235,32 (Zolpidem) e m/z 285,11 > 154,04 (Diazepam) com uma breve corrida cromatográfica de 2,0 minutos. A razão de área do pico (resposta) do analito e do padrão interno foram utilizadas para quantificação do Zolpidem. O limite de quantificação (LQ) alcançado foi de 10 ng/mL; um intervalo linear dinâmico demonstrado pela análise de 1,0-500,0 ng/mL com o coeficiente de determinação (r^2) mínimo de 0,98. Os resultados validados em seletividade, linearidade, exatidão, precisão e estabilidade em plasma, demonstraram a aplicabilidade desta metodologia analítica para estudos farmacocinéticos de acordo com as diretrizes do FDA e ANVISA.

Palavras-Chave: Zolpidem – Espectrometria de Massas – Metodologia Bioanalítica.

ABSTRACT

A sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for Zolpidem quantification in human plasma is presented. Sample preparation consisted of addition of Diazepam as internal standard (IS), liquid-liquid extraction in acidic conditions using a mixture of hexane/ethyl acetate (1:1;V/V) as extracting solvent, followed by centrifugation, solvent evaporation and sample reconstitution in acetonitrile. Both Zolpidem and IS were analyzed using a C18 column and a mobile-phase composed of acetonitrile: ammonium hydroxide 0,1M and formic acid 88% (60:40:0,1;v/v/v). Eluted compounds were monitored using positive mode electrospray (ES) tandem mass spectrometry. Analyses were carried out by selected reaction monitoring (SRM) using the sodiated molecule to ionic fragment combinations of m/z 308,32 > 235,32 (Zolpidem) and m/z 285,11 > 154,07 (Diazepam) with short chromatographic run time of 2.0 min. The peak areas ratio (response) of the analyte and IS were used for quantification of Zolpidem. The achieved limit of quantification (LOQ) was 1,0 ng/mL; assay exhibited a linear dynamic range of 1.0-500.0 ng/mL with a determination coefficient (r^2) of at least 0.98. Validation results on selectivity, linearity, accuracy, precision and stability in plasma, demonstrated the applicability of this analytical method to pharmacokinetic studies accordly to FDA guidelines.

Key words: Zolpidem - mass spectrometry – bioanalytical method

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Pontos da curva de calibração	26
Tabela 2 – Controles de Qualidade	26
Tabela 3 – Equações da curva de calibração das três Linearidades	38

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do Zolpidem.	03
Figura 2 – Modelo de funcionamento do complexo macromolecular do receptor BDZ/GABA _A .	04
Figura 3 – Ilustração do processo de migração diferencial de seus componentes entre a fase móvel e a fase estacionária.	08
Figura 4 - Ilustração da separação analítica de três componentes de uma mistura.	08
Figura 5 – Representação esquemática de um sistema de cromatografia líquida.	09
Figura 6 – Foto de um sistema de cromatografia líquida	09
Figura 7 – Foto de um espectrômetro de massas	11
Figura 8 - Descrição básica do espectrômetro de massas	12
Figura 9 - Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento. Todos os dados foram obtidos de pesquisa realizada em www.isiknowledge.com , no período de 1993 a 2004, considerando as 500 primeiras citações de cada ano. No gráfico aparecem apenas áreas que atingiram mais de 1%.	13
Figura 10 - Número total de artigos publicados envolvendo as técnicas de ionização mais utilizadas. Baseado nos dados obtidos de pesquisa realizada em www.isiknowledge.com , no período de 1993 a 2004.	13
Figura 11 - Ilustração da fonte de <i>electrospray</i> ⁽¹⁴⁾ .	14

Figura 12 - Ilustração do analisador quadrupolar.	15
Figura 13 - Demonstração da aplicação dos potenciais.	16
Figura 14 - Ilustração dos eixos nos quais sofrem influência dos potenciais aplicados.	16
Figura 15 - Ilustração da trajetória dos íons.	17
Figura 16 - Esquema do separador quadrupolo.	17
Figura 17 - Demonstração do espectrômetro de massas triplo quadrupolar	18
Figura 18 - (a) Representação dos símbolos utilizados em um experimento b) MS^2 e c) MS^3 .	18
Figura 19 - Espectro de massas do Zolpidem.	28
Figura 20 - Ilustração dos parâmetros otimizados no modo positivo (ESI+).	28
Figura 21 - Espectro de MS/MS do Zolpidem	29
Figura 22 - Fragmentação proposta para o Zolpidem	30
Figura 23 - Estrutura do Diazepam	31
Figura 24 - A) Plasma branco normal lote 10427/4, cromatograma referente ao zolpidem. B) plasma branco normal lote 10427/4, cromatograma referente ao padrão interno.	33
Figura 25 - A) Plasma branco lipêmico lote 55295/1, cromatograma referente ao zolpidem. B) Plasma branco lipêmico lote 55295/1,	34

cromatograma referente ao padrão interno.

Figura 26 - A) Plasma branco hemolisado lote 17591/11, cromatograma referente ao zolpidem. **B)** Plasma branco hemolisado lote 17591/11, cromatograma referente ao padrão interno. 34

Figura 27 - Solução aquosa de Zolpidem na concentração de 1,0 ng/ml (concentração do limite de quantificação). 35

Figura 28 - Solução aquosa de Diazepam na concentração de 250,0 ng/ml (concentração final de padrão interno na amostra extraída) 35

Figura 29 - Resultados da média das linearidades. 37

Figura 30 - Resultados das análises intra-lote plasma normal. 38

Figura 31 - Resultados das análises intra-lote plasma lipêmico. 38

Figura 32 - Resultados das análises intra-lote plasma hemolisado. 39

Figura 33 - Resultados das análises inter-lote. 39

Figura 34 - Resultados das análises intra-lote. 40

Figura 35 - Resultados das análises inter-lote. 40

Figura 36 - Resultados da recuperação. 41

Figura 37 - Resultados da estabilidade em tempo e condições de análise entre o tempo 0 h e 10 h. 42

Figura 38- Resultados da estabilidade entre os ciclos de degelo. 43

Figura 39- Resultados da estabilidade das amostras não processadas.	43
Figura 40- Resultados da estabilidade das soluções padrão para Zolpidem e Diazepam.	44
Figura 41- Resultados da estabilidade de longa duração.	45

ABREVIATURAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDZs	Benzodiazepínicos
CL-EM-EM	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Seqüencial
CQ	Controle de Qualidade
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CQA	Controle de Qualidade Alto
C_{máx}	Concentração plasmática máxima
ESI	Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GABA-A	Receptor-benzodiazepínico-ácido gamaaminobutírico do tipo A
HUSF	Hospital Universitário São Francisco
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
MRM	Monitoramento de Reação Múltipla.
SPE	Extração líquida em fase sólida
TGI	Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Medicamentos Genéricos.....	1
1.1.1 Histórico.....	1
1.1.2 Definições.....	2
1.2 Zolpidem.....	3
1.3 Fatores que Afetam a Biodisponibilidade de medicamentos.....	6
1.4 Técnica Bioanalítica.....	7
1.4.1 Cromatografia Líquida (LC).....	7
1.4.1.1 Modos de separação.....	9
1.4.1.1.1 Cromatografia no modo normal.....	10
1.4.1.1.1.2 Cromatografia no modo reverso.....	10
1.4.2 Espectrometria de massas (MS).....	11
1.4.2.1 Fonte de íons – <i>Electrospray</i> (ESI).....	12
1.4.2.2 Analisador Quadrupolar.....	15
1.4.2.2.1 Simbologia dos Experimentos de Espectrometria de Massas Seqüencial.....	18
1.4.3 Acoplamento da Cromatografia Líquida à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS).....	19
1.4.4 Tratamento de Amostras.....	20
2. OBJETIVO.....	22
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Método Bioanalítico.....	24
4.1.1 Equipamentos e Materiais.....	24

4.1.2 Preparo das soluções.....	24
4.1.3 Fase Móvel.....	24
4.1.4 Preparo dos Padrões da Curva de Calibração e das Amostras Controle de Qualidade.....	24
4.1.5 Parâmetros do Cromatógrafo Líquido.....	26
4.1.6 Parâmetros do Espectrômetro de massas.....	26
4.1.7 Preparo de Amostras.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
5.1 Desenvolvimento.....	27
5.1.1 Iniciando o Desenvolvimento.....	27
5.1.2 Iniciando a Obtenção do Espectro no Modo MS e Ionização.....	27
5.1.3 Iniciando a Obtenção do Espectro no Modo MS/MS.....	29
5.1.4 Acoplamento da Cromatografia Líquida ao Espectrômetro de Massas.....	30
5.1.5 Padrão Interno.....	30
5.1.6 Tratamento da amostra.....	31
5.2 Validação do Método Bioanalítico.....	32
5.2.1 Validação Pré-estudo.....	32
5.2.2 Seletividade.....	32
5.2.3 Determinação do Limite de Quantificação (LQ).....	36
5.2.4 Linearidade.....	36
5.2.5 Precisão e Exatidão.....	37
5.2.5.1 Intra-Lote.....	37
5.2.5.2 Inter-Lotes.....	39
5.2.6 Validação da Diluição.....	40

5.2.7 Recuperação.....	41
5.3 Estabilidades.....	42
5.3.1 Estabilidade de curta duração.....	41
5.3.1.1 Estabilidade no tempo e condições da análise.....	41
5.3.1.2 Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo.....	42
5.3.1.3 Estabilidade das amostras de plasma não processadas.....	43
5.3.1.4 Estabilidade de solução padrão.....	44
5.3.1.5 Estabilidade de longa duração.....	44
6. CONCLUSÃO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medicamentos Genéricos

1.1.1 Histórico

A indústria de genéricos teve sua origem nos Estados Unidos na década de 60, através de uma iniciativa do governo. Em 1984 os norte-americanos adotaram critérios para o registro desse tipo de medicamento e, posteriormente esses critérios foram adotados internacionalmente. A criação do genérico foi uma alternativa legal do governo norte-americano para reduzir os custos dos tratamentos de saúde e aumentar o acesso da população aos medicamentos. Os genéricos se mostraram desde o início, mais baratos que os medicamentos de referência, isso é possível, pois os genéricos são cópias dos medicamentos de referência que já possuem suas patentes expiradas, assim tendo exonerados os gastos com a pesquisa e desenvolvimento dos mesmos.⁽¹⁾

Em 1999, três anos após o Brasil voltar a respeitar o direito de patentes (1996), foi criado o programa de medicamentos genéricos com a publicação da Lei 9787. Com o passar de 4 anos já se encontravam no país mais de 4 mil apresentações que compreendiam as principais classes terapêuticas e cerca de 60% das prescrições médicas.⁽¹⁾

A legislação brasileira de medicamentos genéricos foi criada com base nas legislações dos Estados Unidos, FDA (Food and Drugs Administration) e do Canadá (Health Canada), pois nesses países os medicamentos genéricos detêm uma parcela significativa do mercado conquistando a confiabilidade da população e da classe médica.⁽¹⁾

De acordo com a legislação brasileira, o medicamento genérico só pode chegar ao consumidor após passar por testes de bioequivalência, que determina que o genérico seja absorvido pelo paciente na mesma velocidade e concentração que o medicamento referência, e pelo teste de equivalência farmacêutica, que garante que o genérico terá composição idêntica do princípio ativo ao medicamento de referência. Esses cuidados com o registro dos medicamentos genéricos, que vai de sua produção até sua comercialização, é essencial para que o mesmo não perca sua principal característica, a intercambialidade com o medicamento referência.⁽¹⁾

Na RDC 135 de 29 de maio de 2003, está disposto que a intercambialidade pode ser sugerida pelo profissional farmacêutico no ato da venda além de requisitos e critérios técnicos para o registro do medicamento genérico.⁽²⁾

1.1.2. Definições

Equivalência terapêutica – Quando dois medicamentos são considerados terapeuticamente equivalentes se eles são farmacologicamente equivalentes e, após administração na mesma concentração, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o que se avalia por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro*.⁽²⁾

Equivalentes farmacêuticos – são medicamentos que contém o mesmo princípio ativo, na mesma quantidade, na mesma forma farmacêutica e podendo ou não conter os mesmos excipientes. Eles também devem conter as mesmas especificações com relação aos parâmetros de qualidade, ou relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso, conforme legislação vigente.⁽²⁾

Medicamentos bioequivalentes – São equivalentes farmacêuticos que ao serem administrados a mesma concentração e com as mesmas condições experimentais, não apresentam diferenças estatisticamente significativas com relação a biodisponibilidade.⁽²⁾

Medicamento inovador – Medicamento comercializado no mercado nacional, que contém pelo menos um princípio ativo, sendo que este deve ter sido patenteado, pela empresa responsável pelo desenvolvimento e introdução no mercado do país de origem, mesmo que a patente já esteja extinta. O medicamento inovador normalmente é o medicamento de referência, mas na ausência, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) indicará o medicamento de referência.⁽²⁾

Medicamento de referência – É o medicamento inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no país, cuja eficácia,

segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente, por ocasião do registro.⁽³⁾

Medicamento genérico – É o medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade, e designado pela DCB ou pela DCI.⁽³⁾

1.2. Zolpidem

O Zolpidem é um novo agonista de receptores benzodiazepínicos. Ele é um agente hipnótico-sedativo não-benzodiazepínico que se tornou disponível nos Estados Unidos em 1993, somente cinco anos depois de estar disponível na Europa. Esse medicamento se mostrou eficaz no tratamento de insônia no início do sono. O FDA (*Food and Drugs Administration*) aprovou o uso para tratamentos por um período de 7-10 dias.⁽⁴⁾

Este medicamento é classificado (IUPAC) com uma imidazopiridina⁽⁴⁾, seu nome é N,N,6-Trimethyl-2-(4-methylphenyl)imidazo(1,2-a)pyridine-3-acetamide.

A Figura 01 demonstra sua estrutura.⁽⁵⁾

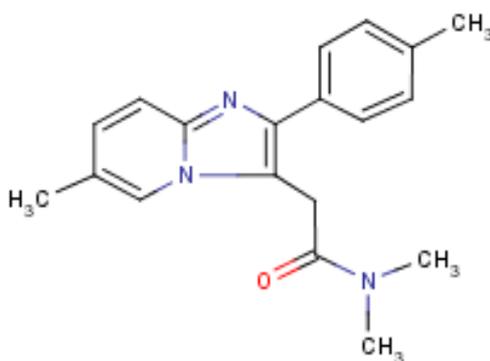


Figura 1 – Estrutura do Zolpidem.

O principal neurotransmissor do sistema nervoso central é o ácido gama amino butírico (GABA). O receptor GABA é o complexo molecular receptor-benzodiazepínico-ácido gama amino butírico do tipo A (GABA-A). Este receptor possui uma região específica para a ligação dos benzodiazepínicos (BZDs) e uma outra para moléculas como os barbitúricos e o álcool, conforme ilustrado na Figura 2. A ligação do GABA e de seus agonistas ao receptor GABA-A produzem uma modificação estrutural com abertura dos canais de cloro aumentando o influxo celular deste íon gerando uma inibição sináptica rápida e hiperpolarização de membrana celular. Existem dois tipos de sub-receptores que fazem parte do complexo GABA-A, o sub-receptor ômega tipo 1, relacionado com efeitos hipnóticos e cognitivos e o subreceptor ômega tipo 2, relacionado com cognição, psicomotricidade, efeitos ansiolíticos, limiar convulsivo, depressão respiratória, relaxamento muscular e potencialização dos efeitos do etanol. Agonistas seletivos GABA-A ômega 1 exercem um efeito hipnótico seletivo e efeitos cognitivos negativos. Os benzodiazepínicos e barbitúricos ligam-se inespecificamente nas subunidades ômega 1 e 2 do GABA-A.⁽⁶⁾

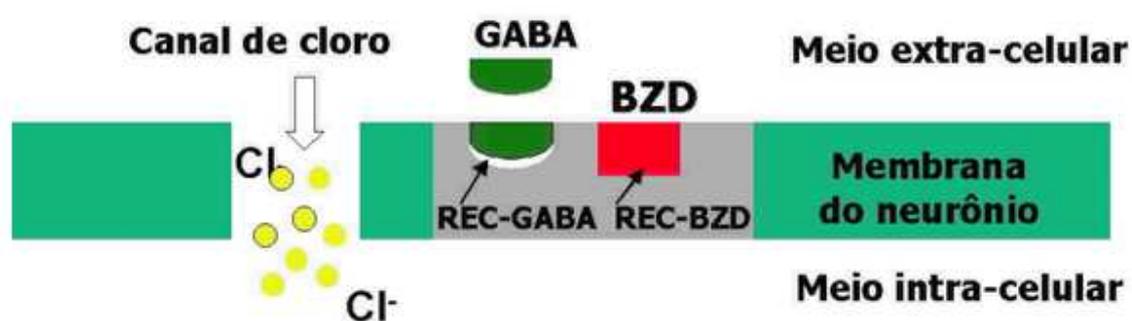


Figura 2 – Modelo de funcionamento do complexo macromolecular do receptor BDZ/GABA_A.

Embora as ações do Zolpidem sejam devido aos efeitos agonistas sobre receptores benzodiazepínicos, e em geral, assemelha-se aos benzodiazepínicos, este fármaco apresenta efeitos anticonvulsivantes fracos em animais de laboratório. Sua ação sedativa é relativamente forte e parece esconder os efeitos ansiolíticos quando testados em animais de laboratório. Ao contrário dos benzodiazepínicos, o Zolpidem

exerce pouco efeito sobre os estágios do sono em seres humanos, mas o fármaco é tão eficaz quanto os benzodiazepínicos na redução da latência do sono e no prolongamento do sono total em pacientes que sofrem de insônia. Depois da interrupção do tratamento com Zolpidem, os efeitos benéficos do sono devem ocorrer por até uma semana, mas pode ocorrer efeito rebote na primeira noite. Foi observado que o Zolpidem melhorou o sono em pacientes que sofriam de insônia crônica por até seis meses de tratamento sem sinais de abstinência ou efeito rebote. Todavia, atualmente o Zolpidem é aprovado apenas para tratamentos em curto prazo. Em doses terapêuticas de 5-20 mg, onde raramente é observado sedação diurna ou amnésia, e a incidência de outros efeitos adversos é diminuída. Como os benzodiazepínicos, o Zolpidem não causa depressão respiratória grave, a não ser quando ingeridos concomitantemente a outros agentes, por exemplo, o etanol.⁽⁴⁾

O Zolpidem é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal (TGI), o metabolismo de primeira passagem resulta em uma biodisponibilidade oral de aproximadamente 70%, mas quando ingerido com alimentos esse valor é mais baixo devido à absorção mais lenta e o fluxo sanguíneo hepático aumentado. O fármaco é quase totalmente eliminado no fígado através da oxidação de grupamento metila nos anéis fenílicos e imidazopiridina nos ácidos carboxílicos correspondentes.⁽⁴⁾

O tempo de meia vida do Zolpidem é de cerca de duas horas, o suficiente para cobrir a maior parte do período típico de sono que é de oito horas. Atualmente a administração do mesmo é aprovada somente ao deitar. A meia vida pode aumentar até duas vezes em pacientes com cirrose e também tende a ser maior em pacientes idosos. A eliminação é mais lenta em pacientes com insuficiência renal crônica.⁽⁴⁾

Os efeitos colaterais cognitivos mais comuns com os hipnóticos são sedação, sonolência, déficits cognitivos e sintomas motores. Os sintomas motores incluem alterações de coordenação motora, afasia, riscos de quedas, fraturas em idosos e acidentes. Em casos raros, efeitos paradoxais como insônia, agitação. A meia vida longa, metabólicos ativos, doses repetidas, idade do paciente e doenças prévias são fatores que causam efeitos residuais.⁽⁶⁾

Podem ocorrer perda de memória quando se toma qualquer hipnótico benzodiazepínico ou não benzodiazepínico. Quanto maior a dose plasmática da droga, maior a probabilidade de ocorrer amnésia. Quanto mais próximo do pico plasmático, maior a probabilidade de amnésia anterógrada. Após tomar o medicamento o paciente não consegue reter novas informações depois de instalado o quadro clínico. Assim, pessoas que precisam realizar tarefas no meio da noite não devem usar esse tipo de medicamento.⁽⁶⁾

Os hipnóticos devem ser contra-indicados em pacientes com história de abuso de álcool, mulheres grávidas, doença pulmonar obstrutiva crônica, miastenia gravis, porfiria e em pessoas com necessidade de operar máquinas perigosas ou veículos.⁽⁶⁾

O desenvolvimento de novos medicamentos deve levar em consideração a biodisponibilidade do mesmo no organismo, pois isso pode ser um fator limitante no desenvolvimento de novas formulações.

1.3 Fatores que Afetam a Biodisponibilidade de Medicamentos

A biodisponibilidade de medicamentos que são administrados por via oral podem ser influenciada por vários fatores fisiológicos e físico-químicos. A absorção de um fármaco só ocorre após a sua solubilização, assim processos como desintegração, dissolução e também a permeabilidade da membrana plasmática são fatores determinantes.⁽⁷⁾

A absorção de um medicamento pelas membranas biológicas depende da solubilidade dele nos fluidos gastrointestinais, essa é influenciada por algumas características do próprio fármaco como constante de dissociação, lipossolubilidade, tamanho da partícula, forma cristalina e sua forma molecular como sais ou ésteres.⁽⁷⁾

As características da forma farmacêutica e seus excipientes são fundamentais na biodisponibilidade de fármacos. Existem várias formas farmacêuticas de administração oral de medicamentos, sendo as mais utilizadas: soluções, suspensões, comprimidos, drágeas e cápsulas. As suspensões e as formas farmacêuticas sólidas são as que apresentam as maiores alterações em termos de biodisponibilidade. As suspensões são utilizadas quando o fármaco é insolúvel ou pouco solúvel em água. No

caso das formas farmacêuticas sólidas, o processo de produção e os componentes da formulação fazem com que os mecanismos de biodisponibilidade destas sejam relativamente complexos, atualmente o teste de dissolução é utilizado para garantir a qualidade das formulações lote a lote.⁽⁷⁾

Fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal (TGI) afetam também a biodisponibilidade de medicamentos. Os processos de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e passagem do fármaco através das membranas biológicas são alterados por diversos fatores e assim fazendo com que a absorção de fármacos seja influenciada. A coadministração de fármacos com alimentos, ou outros fármacos altera a absorção do medicamento, assim como também a idade e doenças do trato gastrointestinal alteram a fisiologia do mesmo, alterando a absorção do medicamento.⁽⁷⁾

Para determinar se uma nova formulação de um determinado medicamento genérico é adequada ao consumo humano, realiza-se o estudo de bioequivalência, que usualmente utiliza uma técnica bioanalítica para quantificação do fármaco em plasma humano.

1.4 Técnica Bioanalítica

A espectrometria de massas tem despontado como técnica chave na indústria farmacêutica, atuando desde a pesquisa para a descoberta de novos fármacos como também no controle de qualidade. Através do surgimento do medicamento genérico, em paralelo ao processo de comprovação de equivalência biológica a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) vem conquistando uma relevância político-econômica crucial neste segmento de aplicação tecnológica.⁽⁸⁾

1.4.1 Cromatografia Líquida (LC)

A técnica cromatográfica foi aplicada pela primeira vez em 1903, por M. Tswett, para a separação de pigmentos de plantas. Como a separação gerou bandas coloridas, originou-se o nome cromatografia.⁽⁹⁾

A principal diferença entre a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência e a utilização de fase estacionária com micropartículas

esféricas de 10, 5 e 3 mm. Devido a essas serem menos permeáveis, sugiram as bombas para a eluição da fase móvel. O desenvolvimento dessas novas fases estacionárias aliadas ao desenvolvimento da instrumentação analítica fez com que a cromatografia líquida tivesse uma melhor performance em termos de resolução, quantificação e detecção em menor tempo.⁽¹⁰⁾

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre entre duas fases imiscíveis, ou seja, a fase estacionária e a fase móvel, conforme ilustrado na Figura 3 e Figura 4. Estas interações podem ser realizadas por meio de interações do tipo ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals. O equilíbrio dos analitos podem ser afetados por alguns fatores como: composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura. Mudanças em qualquer um destes fatores levam a alterações na migração diferencial.⁽¹¹⁾

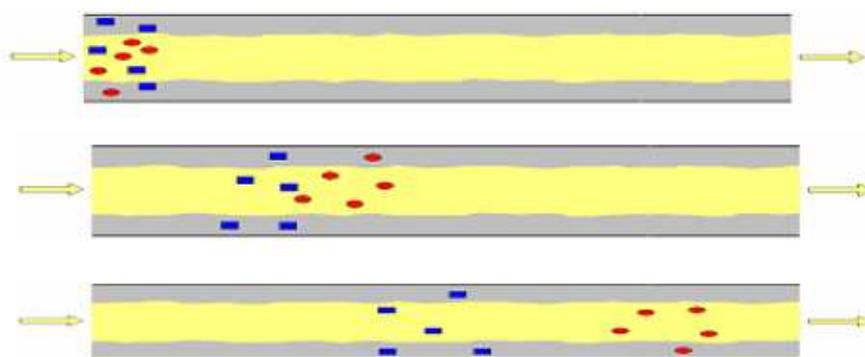


Figura 3 – Ilustração do processo de migração diferencial de seus componentes entre a fase móvel e a fase estacionária.



Figura 4 – Ilustração da separação analítica de tres componentes de uma mistura.

Um sistema de cromatografia líquida é basicamente composto por módulos, que são projetados para proporcionar versatilidade, rapidez, reprodutibilidade e alta sensibilidade a análise a que é destinado. Na Figura 5 está demonstrado um esquema dos componentes de um cromatógrafo líquido. Na Figura 6 esta demonstrada uma foto de um Cromatógrafo Líquido. ⁽¹¹⁾

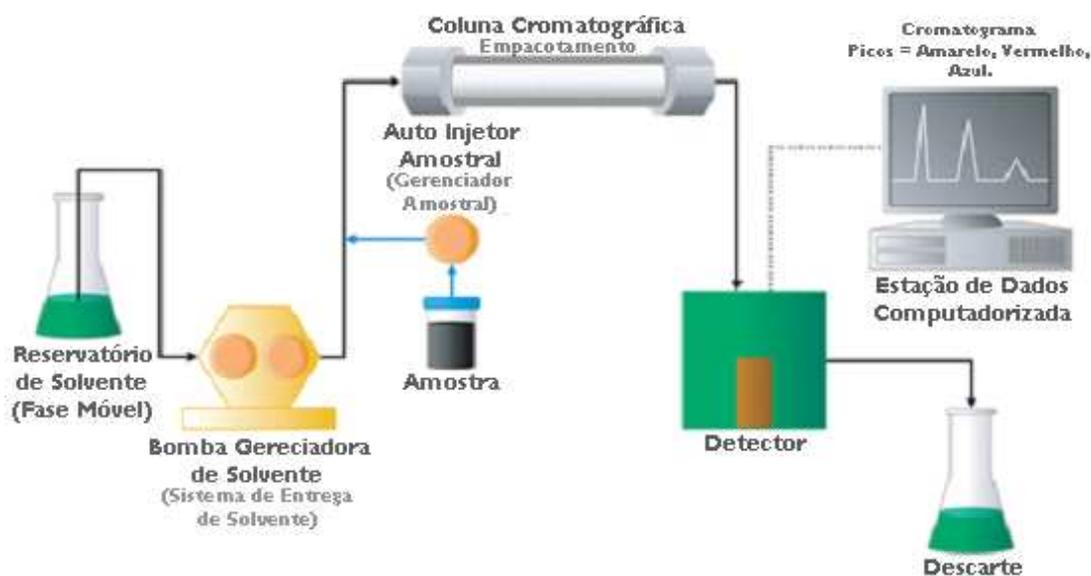


Figura 5 – Representação esquemática de um sistema de cromatografia líquida.



Figura 6 – Foto um sistema de cromatografia líquida.

1.4.1.1 Modos de separação

Deve existir uma relação de interação do analito com as fases móvel e estacionária, e entre fase móvel e fase estacionária. Assim, o modo de separação escolhido depende da fase estacionária e fase móvel para cada classe de analito.⁽¹¹⁾

Existem dois modelos propostos para retenção em cromatografia líquida. Um por Scott e Kucera, interação-solvente, e o outro por Snyder, competição-solvente. Os modelos são equivalentes, uma vez que eles consideram que em uma separação a interação do analito com a fase estacionária permanece constante, portanto, a fase móvel é quem determina a retenção do analito.⁽¹¹⁾

1.4.1.1.1 Cromatografia no modo normal

Na cromatografia de modo normal a polaridade da fase estacionária é maior do que a polaridade da fase móvel. Os solventes utilizados são orgânicos, mas sem a adição de água. A fase estacionária utilizada são adsorventes orgânicos, como sílica e alumina, ou fase polares quimicamente ligadas, como ciano, diol, fenil e amino.⁽¹⁰⁾

Esse tipo de separação é utilizado em grande parte em moléculas neutras, mas também pode ser utilizada para moléculas ionizáveis ou iônicas. A eluição acontece

através da saída das moléculas menos polares seguidas pelas moléculas mais polares que ficam mais retidas pela fase estacionária.⁽¹¹⁾

Quando se encontra traços de água na fase móvel, ocorre-se pouca retenção do analito na fase estacionária, em especial quando se usa sílica não modificada na fase estacionária. Esse problema é resolvido pela utilização de solventes anidros.⁽¹¹⁾

1.4.1.1.2 Cromatografia no modo reverso

Na cromatografia no modo reverso a polaridade da fase móvel é maior do que a fase estacionária. Este método é mais empregado, uma vez que possibilita a utilização de água na composição da fase móvel, dessa forma permite a separação de uma grande variedade de compostos. A fase móvel mais utilizada é uma mistura de acetonitrila/água, podendo substituir a acetonitrila por metanol ou tetrahidrofurano quando necessário. São usados esses três solventes devido à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis com água.⁽¹⁰⁾

O princípio da separação em fase reversa é a hidrofobia e deve-se principalmente a interações entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa. É importante lembrar que a força do solvente em fase reversa aumenta com o decréscimo da polaridade do solvente.

1.4.2 Espectrometria de Massas (MS)

A espectrometria de massas teve seu início com Joseph John Thomson em 1987⁽¹²⁾. A MS é uma das técnicas analíticas mais úteis e poderosas para a investigação científica, além de poder ser aplicada em várias áreas, como ciências biológicas, biomédicas, geologia, produtos naturais, seqüenciamento de proteínas, identificação de marcadores biológicos entre outras.⁽¹³⁾ A Figura 7 apresenta uma foto de um espectrômetro de massas.⁽¹⁴⁾



Figura 7 – Foto de um Espectrômetro de Massas.

Esta técnica tem sido muito utilizada para a medida de isótopos e também para a determinação estrutural de moléculas orgânicas. Considerada atualmente como melhor técnica de detecção para cromatografia, devido a alta sensibilidade a pequenas concentrações bem como pelo fornecimento de informações quantitativas e qualitativas dos compostos separados no cromatógrafo, a MS também permite a distinção de diferentes substâncias com o mesmo tempo de retenção.⁽⁹⁾

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, no qual ocorre a ionização dos analitos, o analisador que faz a separação dos íons e o detector, que faz a geração de sinais elétricos que são mensuráveis. A Figura 8 demonstra uma representação esquemática do espectrômetro de massas.⁽¹¹⁾

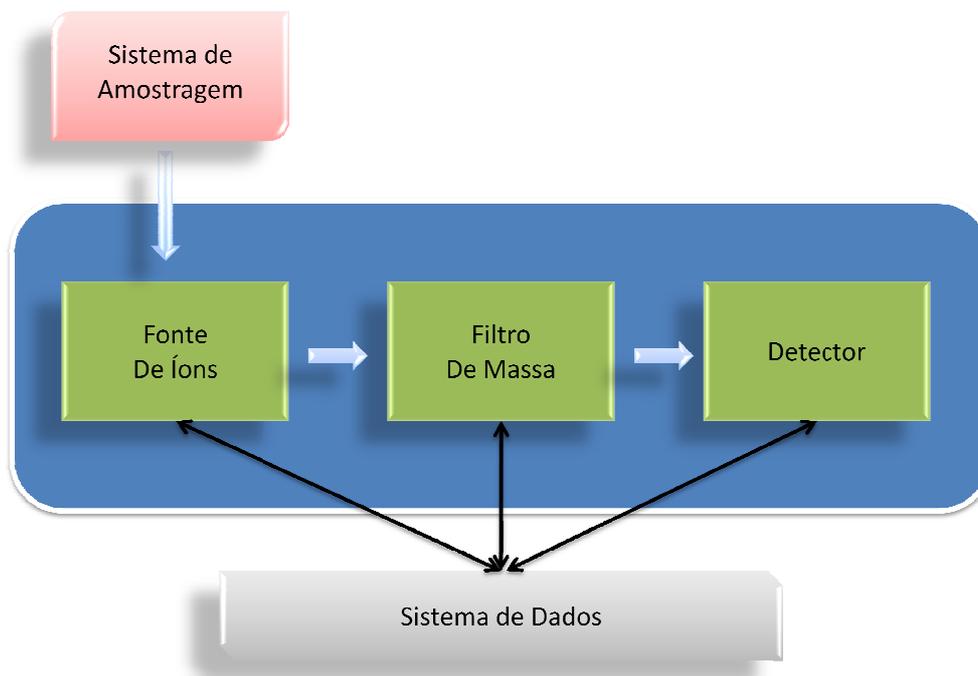


Figura 8 – Descrição básica do espectrômetro de massas.

1.4.2.1 Fonte Íons – *Electrospray* (ESI)

Nos últimos anos a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* vem se difundindo por diversas áreas da ciência conforme apresenta a Figura 9, o número crescente de artigos publicados por essa técnica pode ser visualizado na Figura 10.⁽¹⁵⁾

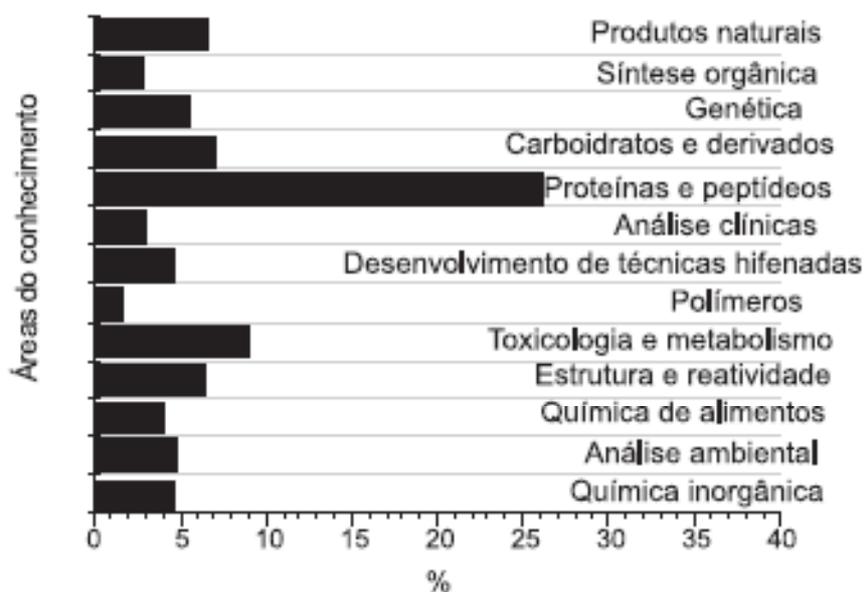


Figura 9 – Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento. Todos os dados foram obtidos de pesquisa realizada no endereço eletrônico www.isiknowledge.com, no período de 1993 a 2004, considerando as 500 primeiras citações de cada ano. No gráfico aparecem apenas áreas que atingiram mais de 1%.⁽¹⁵⁾

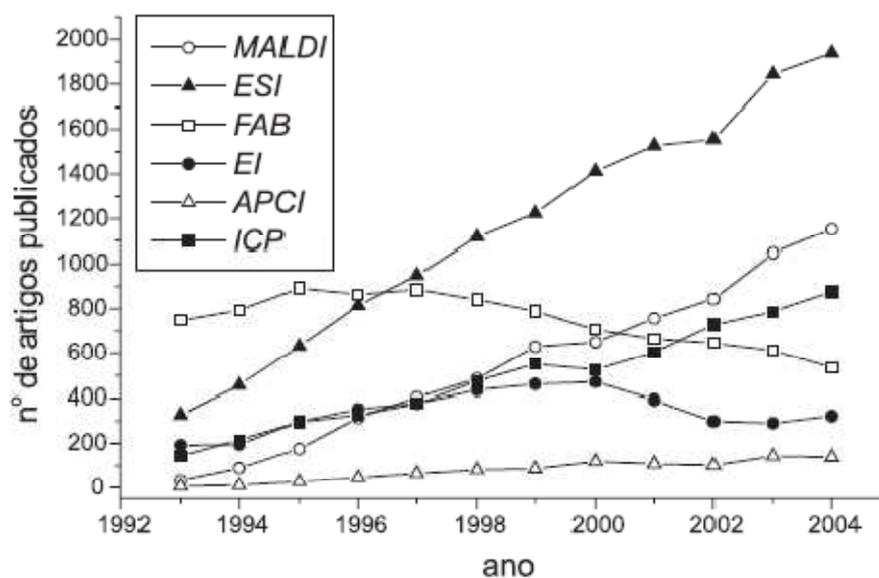


Figura 10 – Número total de artigos publicados envolvendo as técnicas de ionização mais utilizadas. Baseado nos dados obtidos de pesquisa realizada no endereço eletrônico www.isiknowledge.com, no período de 1993 a 2004.⁽¹⁵⁾

Atualmente, na cromatografia líquida ocorreram avanços devido o acoplamento do espectrômetro de massas, isso foi um grande desafio superado pelos cientistas, remover a grande quantidade de fase móvel proveniente do cromatógrafo bem como a transformar moléculas termolábeis em íons gasosos para serem analisados a vácuo. E nesse contexto surgiu a fonte de ionização *electrospray*.⁽¹⁶⁾

O sistema de ESI-MS pode ser definido com um circuito elétrico que encaminha os íons formados em solução para a fase gasosa, conforme ilustrado na Figura 11. Nesse processo, o analito, inicialmente em solução, forma íons carregados em solução que posteriormente serão analisados de acordo com suas respectivas razões massa/carga no MS.⁽¹⁴⁾

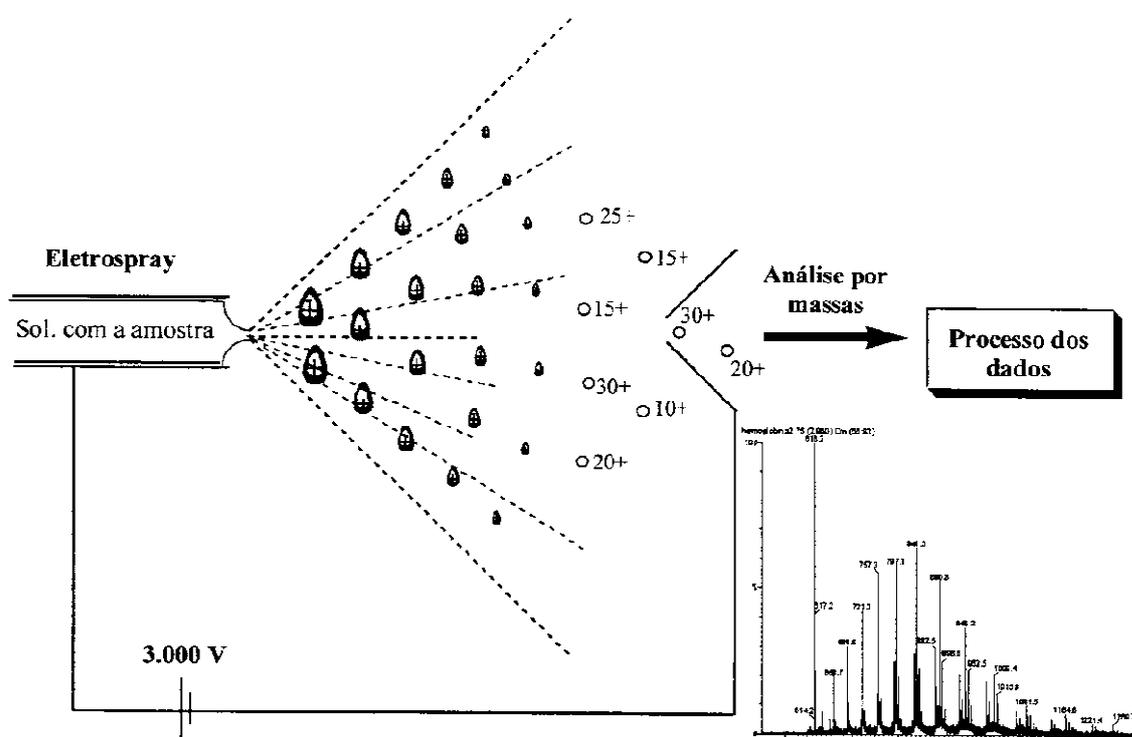


Figura 11 – Ilustração da fonte de *electrospray*.⁽¹⁴⁾

O ESI é um dos métodos de ionização mais brandos, visto que são analisadas amostras que possuem interações como proteína-proteína, ou ainda entre ligantes metálicos em complexos orgânicos.⁽¹⁴⁾

No *electrospray*, o eluente proveniente do sistema cromatográfico, composto pelo solvente e o analito ionizado, são inseridos no espectrômetro de massas, numa vazão adequada, que é no máximo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, através de um capilar de aço que é aplicado um alto potencial, em torno de 4 KV, essa voltagem faz com que as cargas provenientes da solução em análise sejam separadas, isso ocorre por volta de 1% do analito. O gás de nebulização é normalmente o nitrogênio. O líquido carregado eletricamente sai pelo capilar de aço forma um cone (cone de Taylor), que em seguida passa a ser um fino filamento que se dispersa em gotículas carregadas que serão secas através do gás de nebulização e da alta temperatura, e por fim serão analisadas no MS.^(9, 14)

Dois modelos explicam a formação dos íons na fase gasosa: o de carga residual (*charged residue model*, CRM) e o de evaporação de íons (*ion evaporation model*, IEM). No primeiro, as gotículas vão evaporando-se de tal modo que as densidades das cargas vão aumentando, assim começa a ocorrer uma repulsão eletrostática que leva a explosão da gotícula, essa explosão é chamada de explosão de *Rayleigh* (Coulombica), acarretando na formação de gotas menores, carregadas até o ponto que o solvente seja totalmente evaporado. No IEM, as gotículas carregadas vão evaporando-se até ao ponto onde as cargas presentes começam a sofrer repulsão eletrostática ocasionando a evaporação dos íons.⁽¹⁴⁾

1.4.2.2 Analisador Quadrupolar

O analisador de íons quadrupolar é o mais utilizado, sua composição é feita por quatro barras metálicas paralelas conforme ilustrado na Figura 12.⁽⁹⁾



Figura 12 – Ilustração do analisador quadrupolar.

A aplicação de uma combinação de potenciais tempo-independente (dc) e tempo-dependente (ac), faz com que os íons sejam separados no analisador quadrupolar, essa aplicação de potenciais é demonstrada na Figura 13. Quando se aplica um potencial ac e dc, os íons sofrem efeitos sobre a trajetória nos eixos x-z e y-z, respectivamente. Na Figura 14 apresenta a ilustração os eixos nos quais os íons sofrem esses efeitos. O potencial aplicado no eixo x-z é de mesma intensidade do aplicado no eixo y-z, mas os sinais são opostos.⁽¹⁷⁾

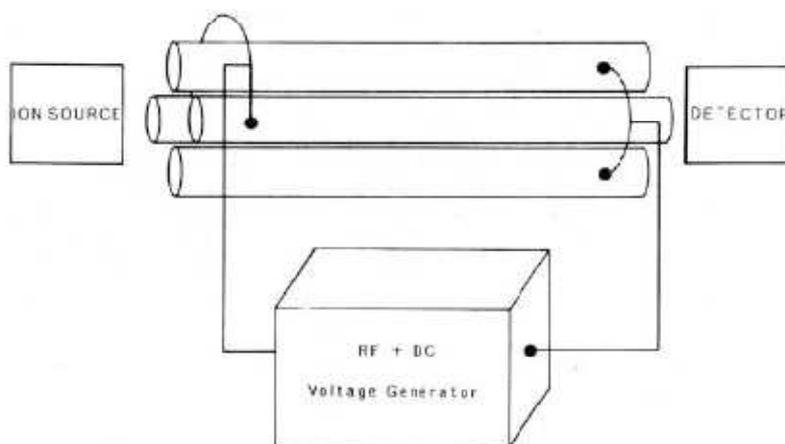


Figura 13 – Demonstração da aplicação dos potenciais.

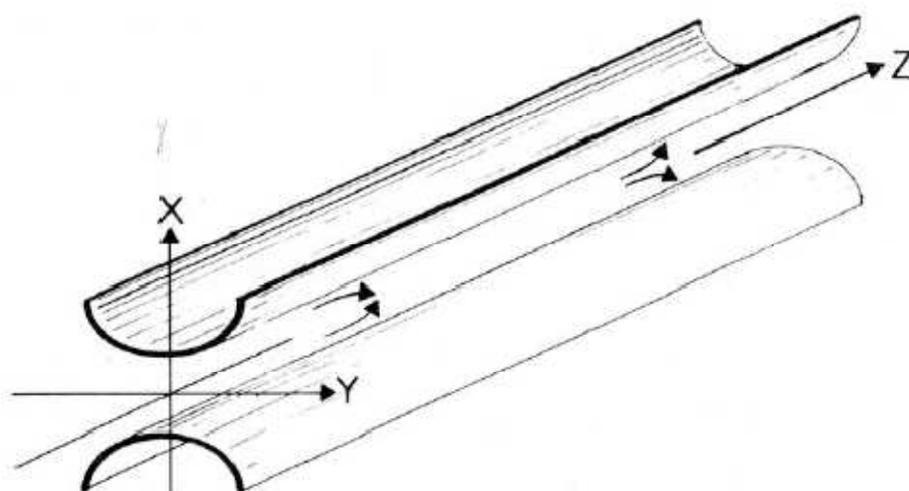


Figura 14 – Ilustração dos eixos nos quais sofrem influência dos potenciais aplicados.

Na aplicação de um potencial ac, e na falta de um potencial dc, o potencial fica oscilando entre positivo e negativo. Caso a análise ocorra com íons positivamente carregados, eles irão para os eixos e em direção ao detector, mas quando forem negativos, os íons colidem com as barras ou saem do analisador e assim não alcançando o detector conforme ilustrado na Figura 15 e Figura 16. Esses processos são influenciados por diversos fatores incluindo a magnitude instantânea do potencial negativo aplicado nos eletrodos e também o tempo que fica aplicado, a posição, a velocidade, e relação m/z da partícula analisada.⁽¹⁷⁾

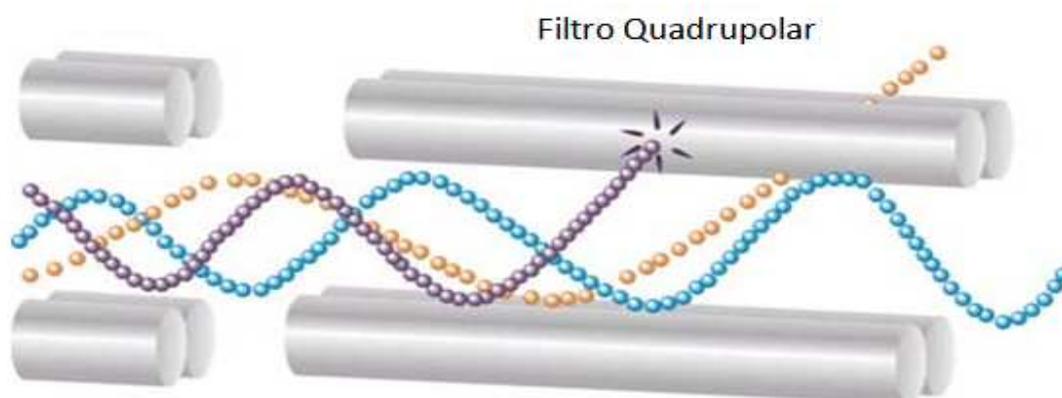


Figura 15 – Ilustração da trajetória dos íons.

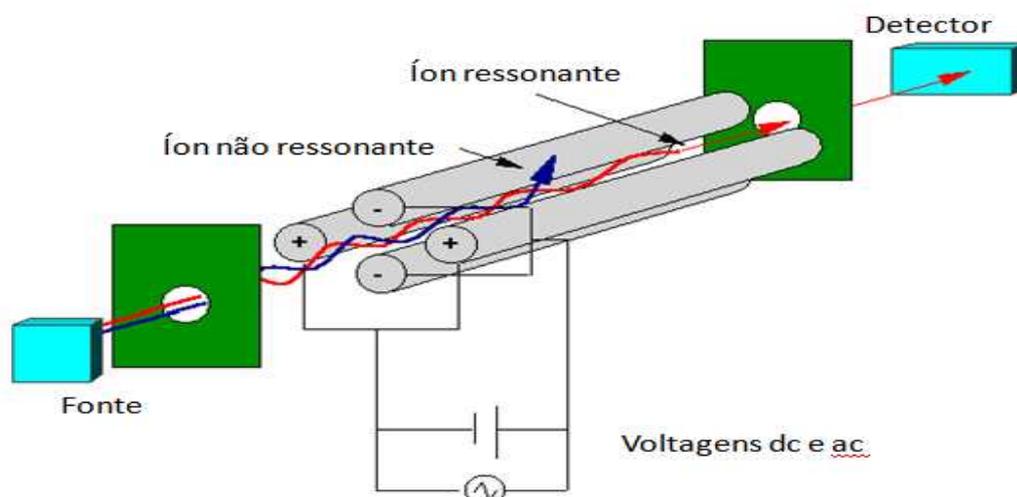


Figura 16 – Esquema do separador quadrupolo.

Quando utilizamos a espectrometria de massas seqüencial o íon precursor é selecionado e da origem a um espectro de massas convencional, os íons filhos são obtidos da fragmentação espontânea ou induzidos do íon precursor. Quando analisamos misturas complexas, os íons filhos fornecem informações inequívocas da presença de um determinado composto, e no caso de compostos desconhecidos, eles fornecem muitas informações estruturais.⁽¹⁸⁾

A Figura 17 demonstra o funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolar. Uma mistura de íons é inserida no quadrupolo Q1, liberando apenas um íon precursor. O segundo estágio q2 o íon precursor colide com as moléculas de N₂ ou Ar em uma pressão de aproximadamente 10⁻⁸ a 10⁻⁶ bar e se fragmenta formando os íons filhos. O quadrupolo Q3 atua como um segundo filtro, permitindo que somente determinados íons filhos passem para o detector.⁽⁹⁾

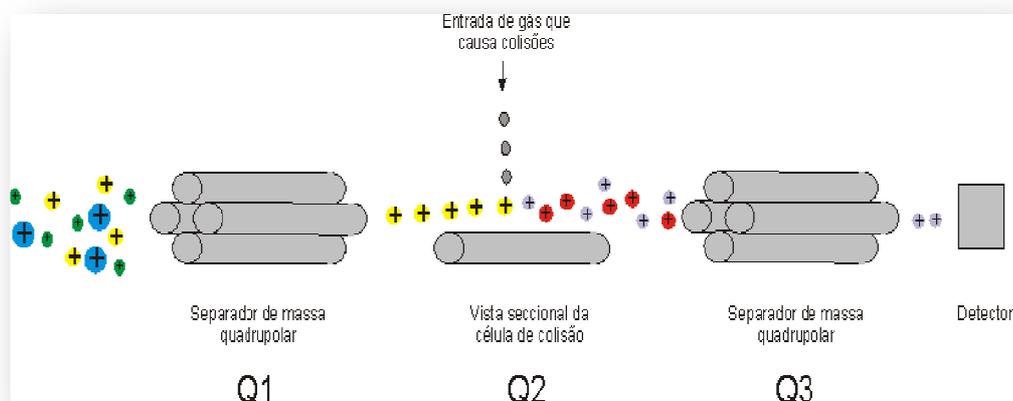


Figura 17 – Demonstração do espectrômetro de massas triplo quadrupolar.

1.4.2.2.1 Simbologia dos Experimentos de Espectrometria de Massas Seqüencial

Logo abaixo na Figura 18, estão demonstradas as simbologias definidas por Meurer e colaboradores para descrever experimentos seqüenciais em espectrômetro de massas de múltiplos estágios.⁽¹⁴⁾

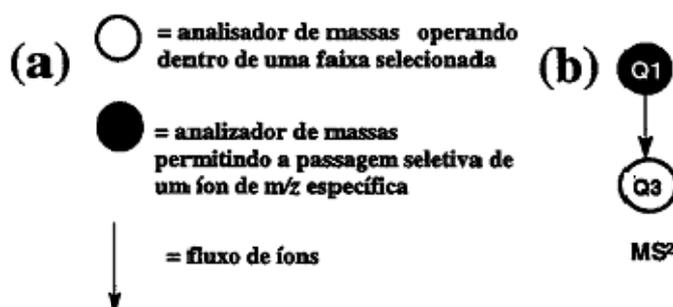


Figura 18 – (a) Representação dos símbolos utilizados em um experimento (b) MS^2 e c) MS^3 .

Na Figura 18a, o círculo vazio representa o analisador de massas no modo varredura, onde são analisadas as razões m/z dos íons que são transmitidos através dele. Já o círculo cheio representa um analisador de massas onde é selecionado um íon de determinada razão m/z e a seta indica o fluxo dos íons através de uma câmara de colisão onde pode ocorrer ganho e perda de massa. A Figura 18b demonstra a

representação utilizada em experimentos de MS², onde o quadrupolo Q1 é utilizado na seleção e o quadrupolo Q3 está analisando os produtos formados na reação com uma molécula neutra em q2.

1.4.3. Acoplamento da Cromatografia Líquida à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

A cromatografia pode ser combinada a vários sistemas de detecção, pois se trata de uma técnica muito utilizada e de excelente desempenho. O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas soma as vantagens da cromatografia, alta seletividade e eficiência na separação, com as do espectrômetro de massas, informações estruturais, massa molar e adicional seletividade.⁽¹⁹⁾

Durante o acoplamento das duas técnicas, é necessário que as características das duas sejam consideradas e respeitadas.⁽¹⁹⁾

Quando se faz o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas, são encontradas algumas incompatibilidades com relação à vazão utilizada na LC e o sistema de vácuo e a fonte de íons do MS. A vazão do eluente da LC é muito grande, na ordem de 1,0 mL/min, de maneira que não é possível que esse eluente vá diretamente para o MS onde se trabalha com pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4}$ Pa². Para que esse acoplamento seja eficaz, é necessário uma fonte de ionização que faça a remoção de toda ou de uma parte significativa da fase móvel.⁽¹⁹⁾

Os compostos analisados pela LC são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis a temperatura, dessa forma não é possível a utilização das fontes de ionização mais comumente aplicadas a MS, assim se tornou necessário o desenvolvimento de formas alternativas de ionização. Dentro desse contexto, surgiu o *electrospray*.⁽¹⁹⁾

É necessário um tratamento prévio das amostras para que estas sejam analisadas através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

1.4.4 Tratamento de Amostras

O tratamento da amostra é de fundamental importância para a cromatografia líquida, pois nesta etapa prepara-se a amostra para que tenha a menor quantidade de interferentes possíveis para que assim não danifique a coluna cromatográfica e seja compatível com o eluente utilizado. Essa etapa é a mais demorada de um método bioanalítico e onde pode ocorrer o maior número de erros.⁽¹⁰⁾

Para materiais biológicos, como soro, urina ou plasma, existem vários tipos de preparo de amostras, entre eles estão à extração líquido-líquido e a precipitação de proteínas. A presença de compostos endógenos pode comprometer a análise desejada, visto que as concentrações encontradas nessas matrizes são muito baixas, na ordem de ng/mL.⁽¹⁰⁾

No caso da extração líquido-líquido, é feita a transferência de um soluto presente em uma matriz complexa para uma fase mais simples como o solvente orgânico, esse tratamento tem como objetivo isolar ou concentrar o analito desejado ou até mesmo separá-lo de interferentes. Comumente é feita a extração de uma solução aquosa com solventes orgânicos, como: éter dietílico, acetato de etila, tolueno e hexano, pois estes têm uma polaridade e densidade diferentes da fase aquosa, isso faz com que os solventes orgânicos permaneçam em uma fase separada da fase aquosa. Essa extração só pode ser realizada se o analito tiver uma lipofilicidade adequada para ser extraída por um solvente orgânico.⁽⁹⁾

Outro tipo de preparo de amostra é a precipitação de proteínas contidas na matriz a ser analisada. A droga e/ou metabólitos ligam-se a proteínas, entretanto esta ligação pode ser quebrada através da precipitação. Esta pode ser realizada através de vários métodos, entre eles, aquecimento, tratamento com ácidos, bases ou solventes orgânicos que são miscíveis com a água, como o metanol, acetonitrila e o etanol. Após o processo de precipitação, faz-se uma centrifugação para separar o precipitado, e o sobrenadante é injetado diretamente no cromatógrafo ou submetido a um processo de extração líquido-líquido.⁽¹⁰⁾

Na extração da amostra, o principal objetivo é a obtenção do analito com o menor número de interferentes possíveis, busca-se uma alta recuperação, precisão e

exatidão do método. Deve-se verificar a solubilidade do composto analisado bem como o grau de pureza do solvente extrator.⁽¹⁰⁾

Como a maioria dos fármacos são compostos ionizáveis, deve-se levar também em consideração o pH da matriz biológica. É muito utilizada a adição de um ácido ou uma base para a neutralização do analito e posteriormente ser extraído com um solvente orgânico.⁽¹⁰⁾

Através de uma validação feita seguindo os critérios aceitos pelas legislações vigentes, ANVISA ou FDA, confirma-se que o método é adequado para a quantificação do fármaco.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para determinação de Zolpidem em plasma humano utilizando Cromatografia Líquida com detecção por Espectrometria de Massas Seqüencial (LC-MS/MS), empregando Diazepam como padrão interno.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Acerca de uma extensa pesquisa bibliográfica na literatura, foram encontrados alguns trabalhos que fizeram a quantificação de Zolpidem em várias matrizes, urina^(20, 21), fluido oral^(22, 23), soro⁽²⁴⁾ e plasma humano^(25, 26, 27, 28, 29, 30, 31), cabelo^(32,33, 29), tecido cerebral⁽³⁴⁾. Para quantificação nessas matrizes foi utilizada cromatografia líquida e gasosa acoplada à espectrometria de massas.

As análises com urina foram feitas em dois trabalhos; em Quintela e colaboradores⁽²⁰⁾ foi utilizado extração em fase sólida e um limite de quantificação foi de 0,02 ug/mL, já em Lалуop e colaboradores⁽²¹⁾, foi feita a quantificação em sangue e cabelo, além da urina, para o sangue encontrou-se um LQ variando entre 1 ng/mL a 2 ng/mL, em cabelo de 0,5 pg/mg a 10 pg/mg e em urina de 10 ng/mL a 25 ng/mL.

Em fluido oral, Kintz e colaboradores⁽²²⁾, utilizaram extração líquido-líquido e obtiveram um LQ de 0,2 ng/mL, já em Concheiro e colaboradores⁽²³⁾, foi feita uma extração em fase sólida para um várias drogas.

Em Hopkins e colaboradores⁽³⁴⁾, para a estudar a saturação dos receptores de atuação do Zolpidem, foi feita a análise em tecido cerebral. A quantificação em cabelo foi feita para análises forenses em dois trabalhos^(32,33) e também para a essa mesma finalidade foi feito em plasma humano^(25, 28, 31).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi utilizada em dois trabalhos^(24, 30), em Maresova e colaboradores⁽²⁴⁾ foi determinado em soro humano para o estudo de drogas de abuso, para isso utilizaram uma extração líquido-líquido com derivatização. Já em Stanke e colaboradores⁽³⁰⁾, foi feito em plasma humano e também foi feito uma extração líquido-líquido, porém não foi feito a derivatização, esse estudo teve a finalidade de avaliar a farmacocinética e também a toxicologia.

Em estudo de bioequivalência farmacêutica, foram encontrados dois trabalhos, o primeiro de Bhatt e colaboradores⁽²⁶⁾, foi feito uma extração em fase sólida, um LQ de 2,5 ng/mL, tempo total de corrida foi de 3,2 minutos. No outro, Couture e colaboradores⁽²⁷⁾, foi feito uma extração líquido-líquido, LQ de 1,0 ng/mL e um tempo total de corrida de 3,5 minutos.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Método Bioanalítico

O princípio desta metodologia foi a extração líquido-líquido do plasma humano do Zolpidem juntamente com seu padrão interno, Diazepam, utilizando o hexano/acetato (50:50 v/v) como líquido extrator. E posteriormente analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

4.1.1 Equipamentos e Materiais

Durante o desenvolvimento e validação da metodologia, utilizamos alguns equipamentos e materiais como: pipetas automáticas Gilson de 1000 e 200 μ L; ponteiros de pipeta descartáveis Axygen; mesa agitadora Fine PCR; misturador Phoenix; balança analítica Precisa CP 225 D SARTORIUS; espectrômetro de massas Micromass / Quatro Micro; cromatógrafo líquido Shimatzu; programa de gerenciamento dos dados MassLynx 4.1; diversos reagentes (acetonitrila, ácido fórmico, hidróxido de amônio, hexano, acetato de etila e água purificada Milli-Q) e também plasma humano normal, lipêmico e hemolisado.

4.1.2 Preparo das Soluções

Durante a validação do método foram utilizadas algumas soluções de Zolpidem e Diazepam. Para o Zolpidem, preparou-se uma solução de 500 μ g/mL e para o Diazepam 100 μ g/mL. Estas foram devidamente armazenadas em frasco adequado, rotuladas e armazenadas em geladeira a +4°C, e substituídas de acordo com os prazos de validade.

4.1.3 Fase Móvel

A fase móvel utilizada foi acetonitrila / hidróxido de amônio 0,1 M / ácido fórmico 88% (60:40:0,1% v/v/v), está foi preparada de acordo com a necessidade e substituída diariamente.

4.1.4 Preparo dos Padrões da Curva de Calibração e das Amostras Controle de Qualidade

Após uma pesquisa bibliográfica determinou-se a concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) para a dose a ser administrada, em seguida determinou-se a concentrações dos pontos da curva de calibração e também dos controles de qualidade. Foram definidos oito pontos na curva de calibração além da amostra branca (matriz biológica sem o fármaco e padrão interno) e amostra zero (matriz biológica sem o fármaco e com o padrão interno), conforme legislação vigente. O primeiro ponto da curva é o LQ e o último seria aproximadamente o dobro do $C_{m\acute{a}x}$, os demais pontos são distribuídos entres esses dois, ficando mais próximos do $C_{m\acute{a}x}$. Na tabela 1 estão demonstrados os pontos da curva de calibração.

Tabela 1 – Pontos da curva de calibração.

Amostra	Concentração no Plasma (ng/mL)
Branco	0
Zero	0
Zolpidem	1,0
Zolpidem	10,0
Zolpidem	20,0
Zolpidem	50,0
Zolpidem	100,0
Zolpidem	300,0
Zolpidem	500,0

Os controles de qualidade foram determinados de acordo com a legislação vigente. Nesta o controle de qualidade baixo (CQB) é determinado como sendo três vezes a concentração do limite de quantificação (LQ), o controle de qualidade alto (CQA), como sendo de 75-90% do ponto mais alto da curva e o controle de qualidade médio (CQM) seria a média aproximada do CQB e CQA.

Na tabela 2 estão demonstrados os valores determinados dos controles de qualidade

Tabela 2 – Controles de qualidade.

Amostra	Concentração no Plasma (ng/mL)
CQB	3,0
CQM	200,0
CQA	400,0

Após o preparo dos pontos da curva de calibração e controles de qualidade, estes foram aliqotados em frações de 200 uL e armazenados a -70°C

4.1.5 Parâmetros do Cromatógrafo Líquido

Foi utilizada uma coluna analítica Polaris C18 (3u, 50 mm x 2,0 mm), com um fluxo de 0,25 mL/min, um volume de injeção de 3 uL e um tempo total de corrida de 2 minutos. O tempo de retenção para o Zolpidem foi de 0,84 min e para o Diazepam de 1,13 min.

4.1.6 Parâmetros do Espectrômetro de Massas

Os parâmetros do equipamento que foram utilizados para o monitoramento do Zolpidem e Diazepam são: fonte de ionização por electrospray operando em modo positivo (ESI+) e MRM 308,32 > 235,32 e 285,11 > 154,07 para monitoramento do Zolpidem e Diazepam respectivamente, a temperatura da fonte foi de 110°C e dessolvatação de 500° C, o fluxo dos gases do cone e dessolvatação foram de 30 e 600 L/h, respectivamente, os valores de voltagem do capilar, cone e energia de colisão foram, respectivamente, 3,0 kV, 33,0 V e 30,0 eV para Zolpidem e 3,0 kV, 30,0 v e 25,0 eV para Diazepam, tendo como pressão de argônio para a dissociação $6,16 \times 10^{-3}$ mbar.

4.1.7 Preparo de Amostras

Foi utilizado no preparo da amostra, o procedimento de extração descrito em seguida. Este procedimento foi aplicado durante o desenvolvimento e validação do

método tanto para os pontos da curva de calibração quanto para os controles de qualidade.

1. Primeiramente em tubos eppendorff colocou-se 200 uL de plasma humano e 50 uL da solução de Diazepam na concentração de 1,0 µg/mL em acetonitrila.
2. Em seguida, adicionou-se 1000 uL de hexano / acetato de etila (50:50 v/v) e agitou-se por 5 minuto em mesa agitadora.
3. Após agitação, centrifugou-se as amostras a 13200 rpm, durante 10 minutos, à 4°C.
4. Depois transferiu-se 700 uL do sobrenadante para tubos eppendorff, evaporou-se o solvente sob fluxo de ar comprimido, ressuspendeu-se o resíduo em 200 uL de acetonitrila e agitou-se por 2 minuto na mesa agitadora.
5. Finalmente, transferiu-se as amostras para inserts de vidro descartáveis e, em seguida, injetou-se alíquotas de 3 uL no sistema cromatográfico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento

5.1.1 Iniciando o Desenvolvimento

O Zolpidem é uma molécula solúvel em água, assim esse é um fármaco que pode ter um pouco de dificuldade para ser extraído do plasma humano. Conforme verificamos na Figura 01, o Zolpidem é um fármaco que contém funções básicas, aminas e amidas, o que fez com que utilizamos o modo positivo para a análise no espectrômetro de massas. Diante da basicidade apresentada pela molécula de Zolpidem, as soluções iniciais de trabalho foram preparadas em metanol/água e acetonitrila/água com a adição de um modificador orgânico, como o ácido fórmico, para facilitar a protonação da molécula. A utilização de um solvente orgânico e água polar são muito importantes, o primeiro ajuda na secagem do spray e o segundo é devido à ionização ser facilitada em água. A proporção utilizada pode variar bastante, o que é influenciada pela solubilidade do composto a ser analisado.

5.1.2 Iniciando a Obtenção do Espectro no modo MS e Ionização

Para iniciarmos a obtenção do espectro de MS, foi escolhida uma faixa de massa molecular que compreendia o Zolpidem. Após isso, foram colocadas as condições padrões para o início do desenvolvimento no modo positivo (ESI+: resolução do primeiro quadrupolo 15 V, energia de saída do íon do primeiro quadrupolo 1 V, entrada no quadrupolo de colisão 50 V, energia de colisão 1 V, saída do quadrupolo de colisão 50 V, resolução do terceiro quadrupolo 15 V, saída do terceiro quadrupolo 3 V, detector multiplicador de elétrons 950 V). Depois de serem carregadas essas condições pelo software de gerenciamento do espectrômetro de massas, iniciamos a infusão das soluções feitas em diversos solventes com um fluxo variando de 10 uL/mim a 50uL/mim. Após este processo, verificou-se que o solvente mais adequado foi a acetonitrila/água com ácido fórmico; conforme demonstramos na Figura 19 os espectros de massas do íon mais intenso.

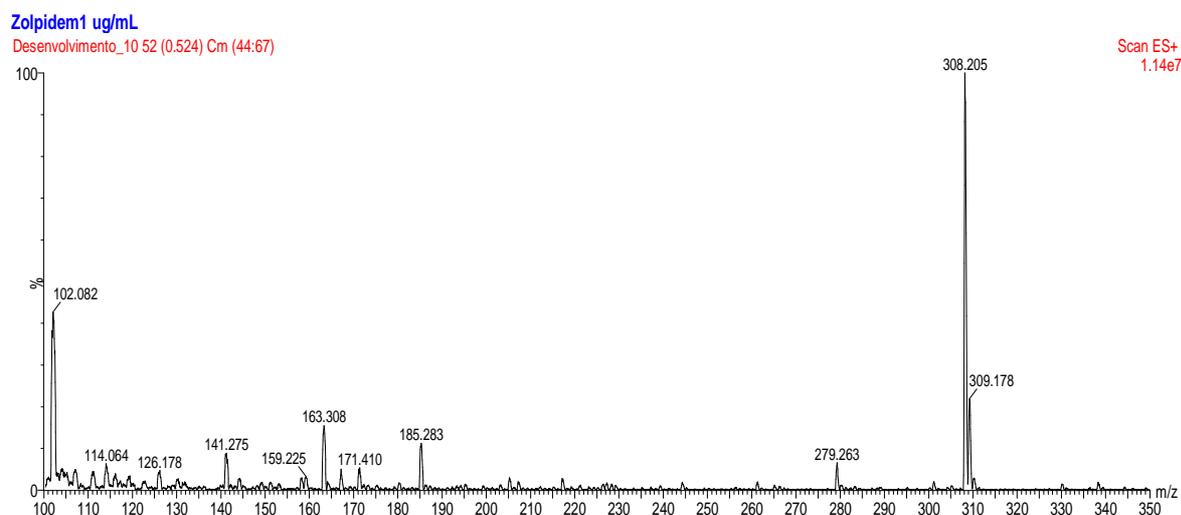


Figura 19 - Espectro de massas do Zolpidem.

Após o solvente mais adequado ter sido escolhido, foi infundido de forma on-line uma solução de 1 ug/mL Zolpidem para a otimização das voltagens que inclui capilar, cone, extrator, lente rf, temperatura do bloco e de gás de dessolvatação, bem como de fluxo de gás de cone e dessolvatação. Essa primeira otimização é chamada de “grosseira”, tendo em vista que ela não leva em consideração a cromatografia líquida,

pois nesta são utilizados fluxos maiores (100 a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$). Na Figura 20, pode-se observar os parâmetros otimizados.

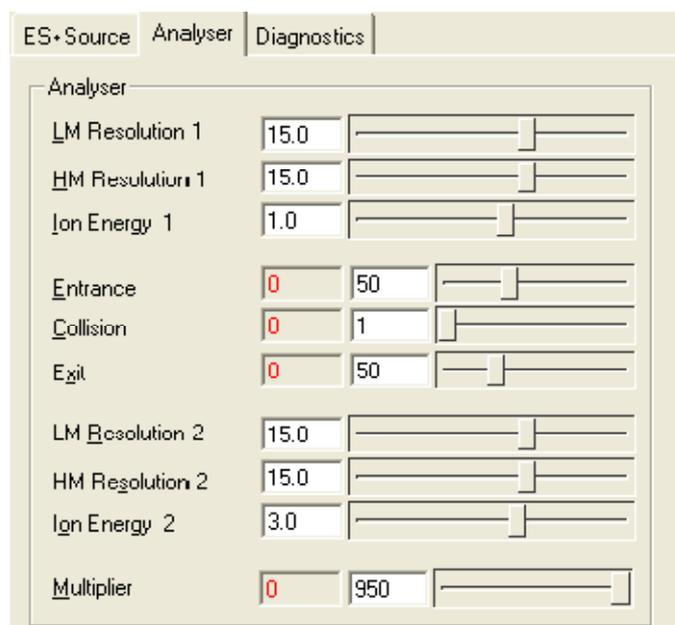


Figura 20 – Ilustração dos parâmetros otimizados no modo positivo (ESI+).

Os parâmetros foram otimizados individualmente, visando o aumento da corrente iônica para a espécie em questão e também a estabilidade do íon.

A obtenção do espectro de massas no modo MS é muito importante, pois possibilita a verificação da degradação do padrão que está sendo utilizado e se não ocorreu erro durante o preparo da solução.

5.1.3 Iniciando a Obtenção do Espectro no modo MS/MS

As condições utilizadas na obtenção do espectro de massas no modo MS/MS foram quase todas iguais as do modo MS, diferindo a voltagem de entrada na cela de colisão para -1, a energia de colisão para um valor maior que 0 V e energia de saída do quadrupolo de colisão para 1 (o gás de colisão foi aberto com uma pressão inicial na cela de 3×10^{-3} Torr), essas condições aumentam a intensidade dos sinais no espectro de MS/MS. Essas fazem com que selecionamos a massa do íon precursor no primeiro

quadrupolo; enquanto no segundo quadrupolo é feita a fragmentação através do gás de colisão (argônio) e no terceiro quadrupolo a varredura do íon precursor.

Em seguida foram otimizados a voltagem de colisão e a pressão na cela de colisão, mas agora observando o íon precursor. Na Figura 21, está demonstrado o espectro de MS/MS e na Figura 22 a fragmentação proposta.

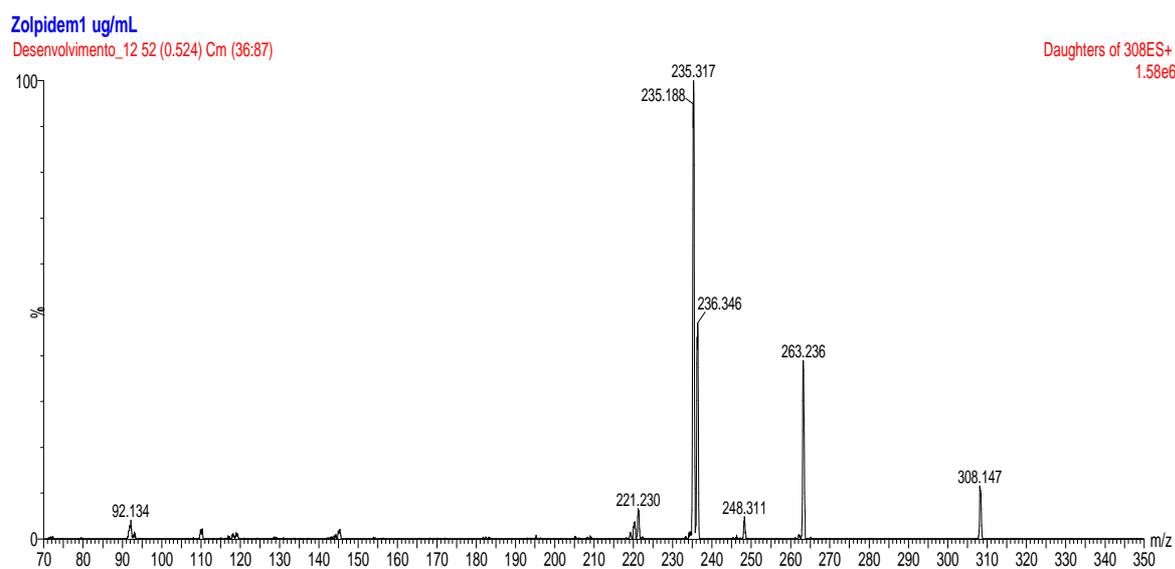


Figura 21 – Espectro de MS/MS do Zolpidem.

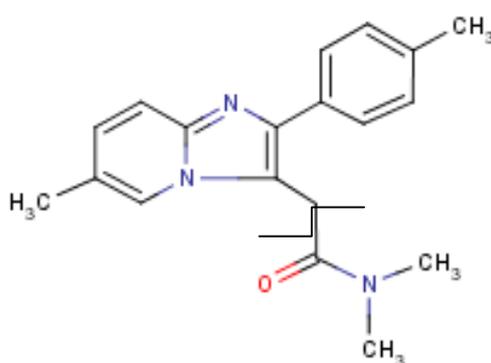


Figura 22 – Fragmentação proposta para o Zolpidem.

5.1.4 Acoplamento da cromatografia líquida ao espectrômetro de massas

No acoplamento, foi utilizada a fase móvel com a composição dos solventes igual à utilizada no modo MS e também a menor coluna cromatográfica disponível (Polaris 3 C18 50 x 2,0 mm).

A função MRM (monitoramento de reação múltipla), que é gerada pelo espectro de MS/MS, é utilizada para o monitoramento dos compostos iônicos que emergem da coluna cromatográfica, para o Zolpidem o MRM foi de 308,32 > 235,32 (energia do cone 33V e energia de colisão de 30V). Esta função é utilizada quando é feito o acoplamento do espectrômetro de massas a cromatografia líquida, pois promove o máximo de seletividade e sensibilidade. A energia do cone e colisão foram otimizadas para aumentar a intensidade do sinal.

Com a função MRM pronta, foram otimizados tanto a fonte como os analisadores, o que chamamos de sintonia fina.

Em seguida foram feitos ajustes no sistema cromatográfico como lavagem da agulha e ajuste do volume de injeção para minimizar o efeito de *carry-over*.

5.1.5 Padrão interno

A escolha do padrão interno segue a linha de raciocínio onde o ideal é uma molécula muito parecida com o Zolpidem, mas com massa molecular diferente. O próprio analito deuterado seria a melhor escolha se o seu preço não fosse tão elevado, diante disso escolhem-se compostos com estrutura similar, que tenha as mesmas características de solubilidade e também suas funções orgânicas. Diante disso o Diazepam foi o padrão interno escolhido, sua estrutura é demonstrada na Figura 23.

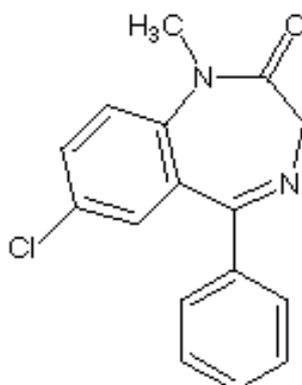


Figura 23 – Estrutura do Diazepam.

O Diazepam foi utilizado para corrigir ou constatar algum possível problema na metodologia de extração, visto que ele tem concentração fixa e está em um canal diferente do analito. Como nosso método de quantificação é feito através da razão entre a área do nosso analito e do seu padrão interno, através do desvio padrão conseguimos verificar se ocorreu algum erro e se este foi corrigido pelo padrão interno.

Após a escolha do Diazepam, foram procedidos as mesmas etapas do MS, MS/MM e MRM para o padrão interno.

Com as funções MRM do Zolpidem e do Diazepam prontas, foi feita a contaminação cruzada, onde é verificado após injeção se um está contaminando o canal do outro.

5.1.6 Tratamento da amostra

Utilizamos para a extração de amostras, plasma branco, plasma branco com padrão interno e plasma com concentrações de LQ, CQB, CQM e CQA. Foram verificadas possíveis contaminações nos solventes e aparatos de extração além de interferentes endógenos e recuperação.

O volume de matriz biológica utilizada foi de 200 uL, chegamos a esse volume após otimização, esse é o melhor pois demonstra ser melhor agitado em tubos de 2 mL.

A adição do padrão interno deve levar alguns fatos em consideração, o volume deve ser adequado para que não ocorra precipitação de proteínas muito pronunciada, o que dificulta a homogeneização. Diante disso, o volume adicionado foi de 50 uL de uma solução de 4 ug/mL de Diazepam.

O líquido extrator é utilizado para extrair o fármaco e seu padrão interno da matriz aquosa para o solvente orgânico. A volume de 1000 uL é adequado (5 vezes o volume de plasma humano) pois uma volume menor do que esse pode ser saturado com o Zolpidem e um volume maior pode não ter homogeneização adequada. O solvente orgânico que apresentou melhores resultados de reprodutibilidade e recuperação foi o hexano/acetato de etila (50:50 v/v).

Por fim este método foi testado através da análise de uma exatidão e submetido à validação analítica conforme a RE 899 da ANVISA.

5.2 Validação do Método Bioanalítico

A partir deste ponto, serão apresentados os resultados obtidos durante a validação da metodologia bioanalítica de Zolpidem em plasma humano utilizando como padrão interno o Diazepam.

Estes resultados foram preparados para contemplar a validação pré-estudo que inclui os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e recuperação, além de definir parâmetros de estudos como: limite de quantificação, concentração dos padrões de calibração e das amostras de controle de qualidade, e também determinar a estabilidades das amostras tanto em solução quanto em plasma humano.

5.2.1. Validação Pré-estudo

Os padrões de referência utilizados durante esta validação estavam dentro do prazo de validade permitido pelo fabricante.

5.2.2 Seletividade

Para o teste da seletividade foram feito análises de amostra de plasma branco de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e outra hemolisada,

com os respectivos lotes: 10427/4; 42931/6; 48934/6; 52536/3; 55295/1 E 17591/11, obtidos no Hospital Universitário São Francisco (HUSF).

As amostras foram analisadas através do procedimento de extração e condições cromatográficas adequadas, no intuito de identificar a presença de interferentes no tempo de retenção do Zolpidem (0,84 min.) e do Diazepam (1,13 min.), quando comparados com uma solução aquosa do fármaco na concentração próxima ao limite de quantificação e do padrão interno próximo da sua concentração final.

Logo abaixo serão demonstrados os cromatogramas de um plasma normal (Figura 24), um lipêmico (Figura 25) e um hemolisado (Figura 26).

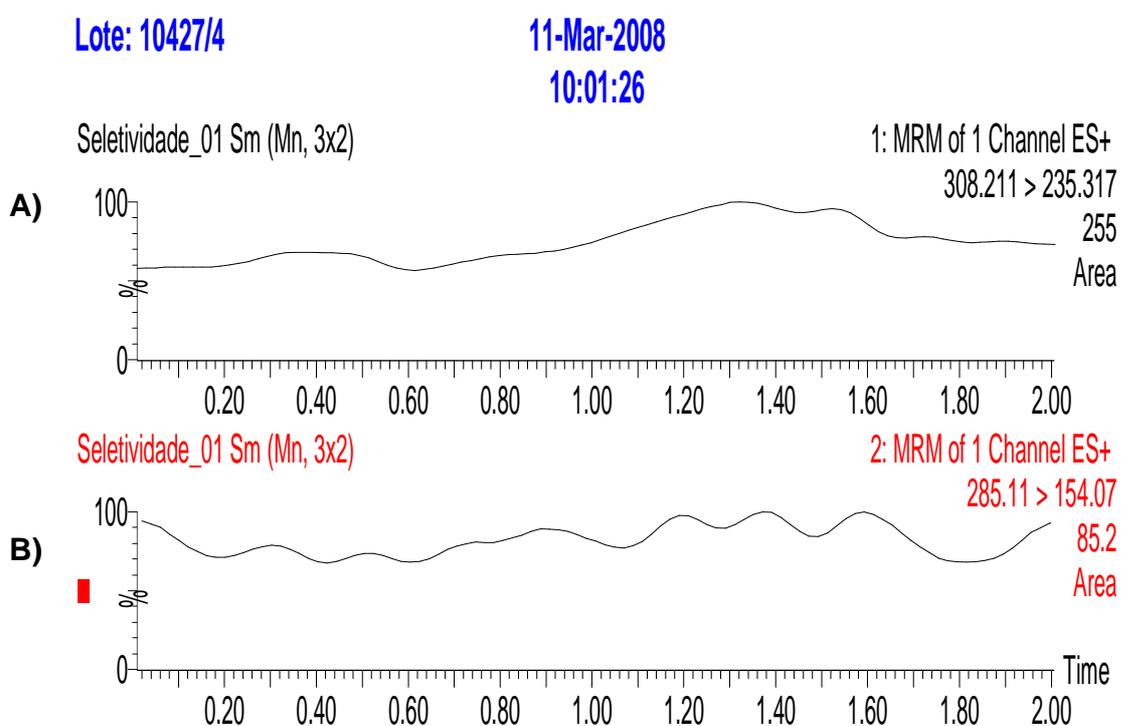


Figura 24 – **A)** Plasma branco normal lote 10427/4, cromatograma referente ao zolpidem. **B)** plasma branco normal lote 10427/4, cromatograma referente ao padrão interno.

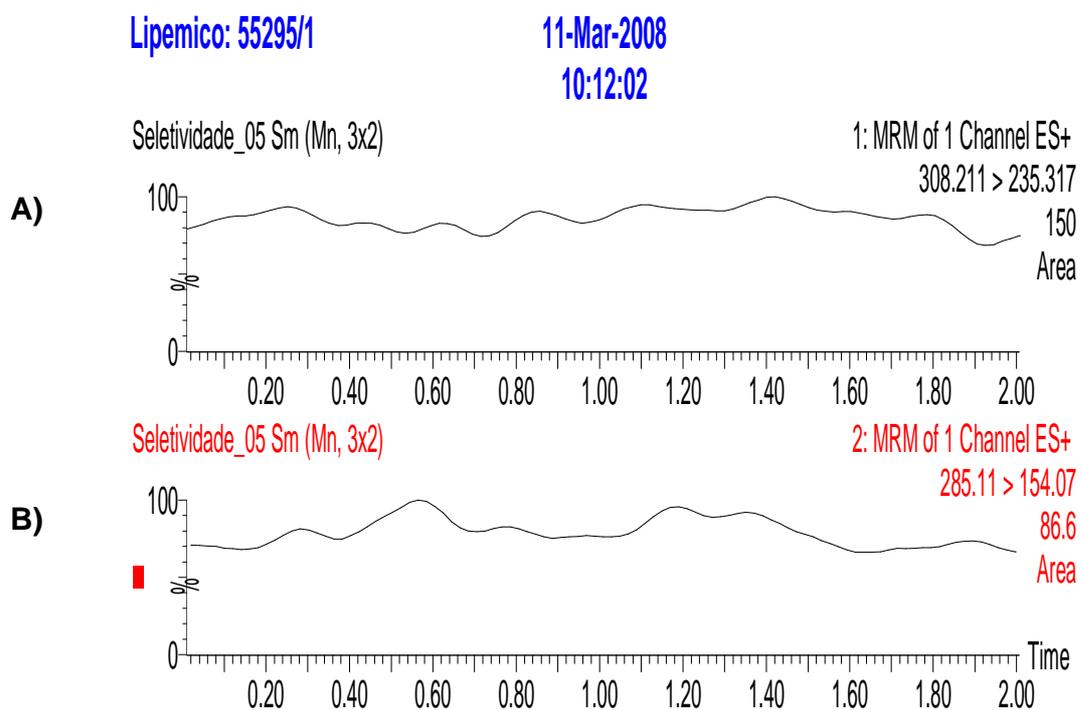


Figura 25 – **A)** Plasma branco lipêmico lote 55295/1, cromatograma referente ao zolpidem. **B)** Plasma branco lipêmico lote 55295/1, cromatograma referente ao padrão interno.

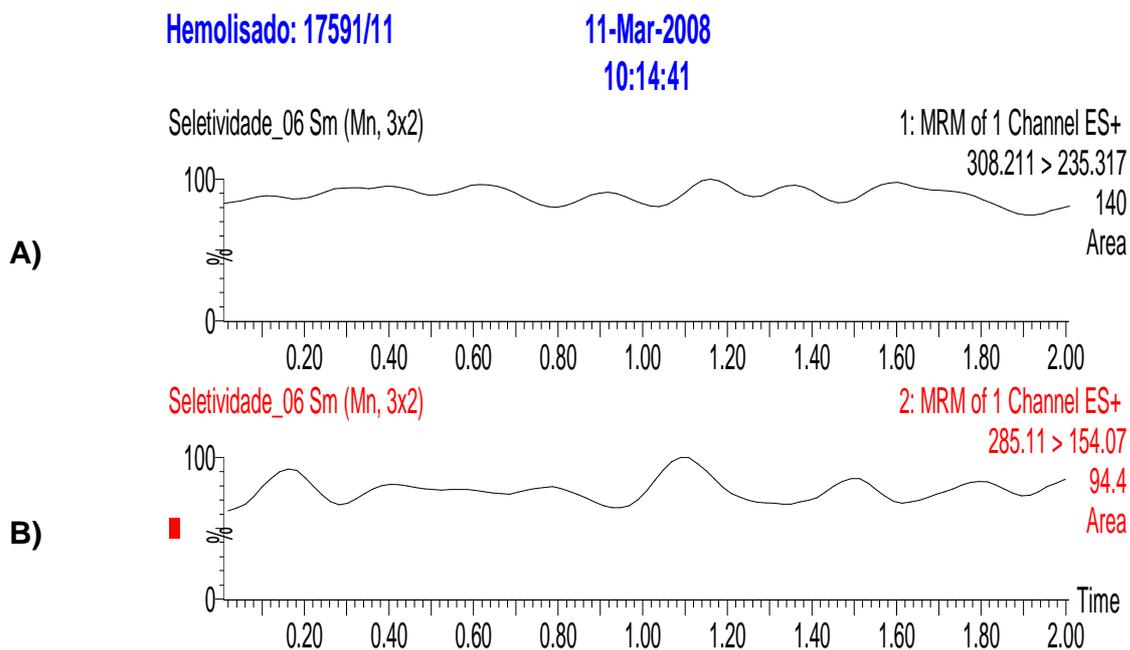


Figura 26 – A) Plasma branco hemolisado lote 17591/11, cromatograma referente ao zolpidem. **B)** Plasma branco hemolisado lote 17591/11, cromatograma referente ao padrão interno.

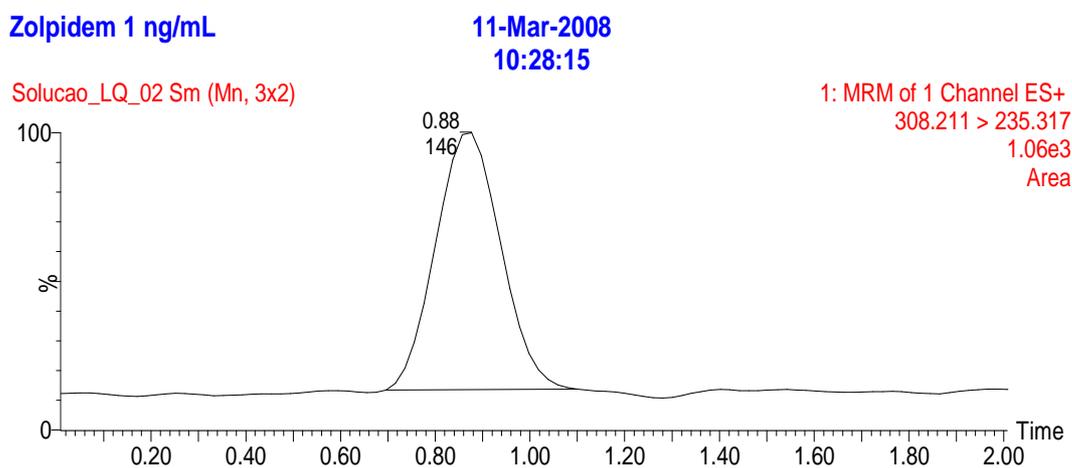


Figura 27 – Solução aquosa de Zolpidem na concentração de 1,0 ng/ml (concentração do limite de quantificação).

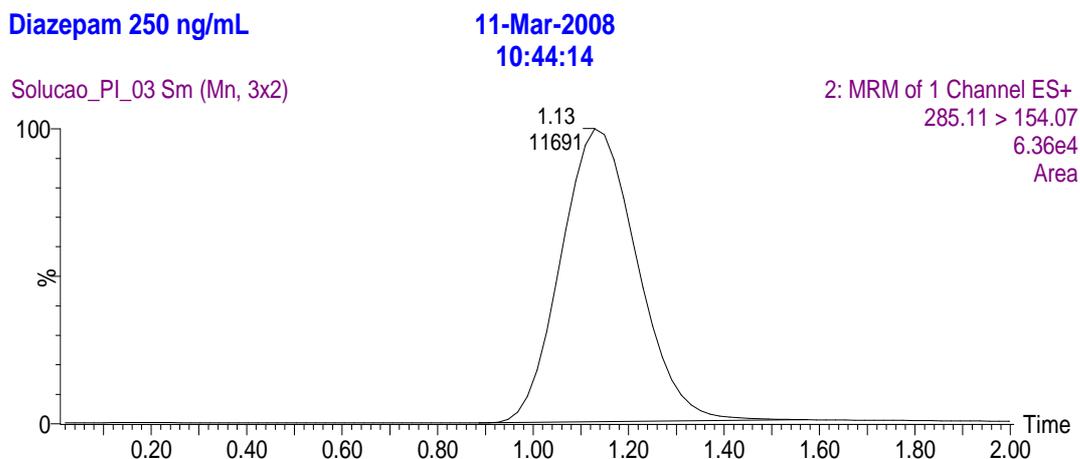


Figura 28 – Solução aquosa de Diazepam na concentração de 250,0 ng/ml (concentração final de padrão interno na amostra extraída).

Os cromatogramas demonstraram que não foram encontradas interferências significativas nos tempos de retenção do Zolpidem e do Diazepam.

5.2.3 Determinação do limite de quantificação (LQ)

A determinação do limite de quantificação foi feita levando em consideração a sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão pretendidas para o método bioanalítico. Isso foi feito através da análise de concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão adequados para o método bioanalítico.

O limite de quantificação foi definido seguindo alguns parâmetros.

A resposta de pico para o LQ deve ser no mínimo de 5 vezes maior do que qualquer interferente presente na amostra branco no mesmo tempo de retenção. O pico resposta do Zolpidem de LQ deve ser identificável e reprodutível com uma precisão de até 20% e uma exatidão entre 80-120% em relação à concentração nominal, isso deve ser analisado com no mínimo cinco amostras de padrões.

Seguindo esses critérios, chegamos que o nosso limite de quantificação foi de 1,0 ng/mL.

5.2.4. Linearidade

Alguns parâmetros foram seguidos para a determinação da linearidade.

O desvio deve ser menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal do LQ em pelo menos duas das triplicatas e, menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal das demais concentrações da curva e também em pelo menos duas das triplicatas. Das seis concentrações da curva de calibração, quatro devem obedecer aos parâmetros acima descritos, incluindo o LQ e o ponto de maior concentração da curva. E por último, o coeficiente de correlação deve ser maior ou igual a 0,98.

As médias dos valores das linearidades estão representadas na Figura 29 e as curvas de calibração na Tabela 3.

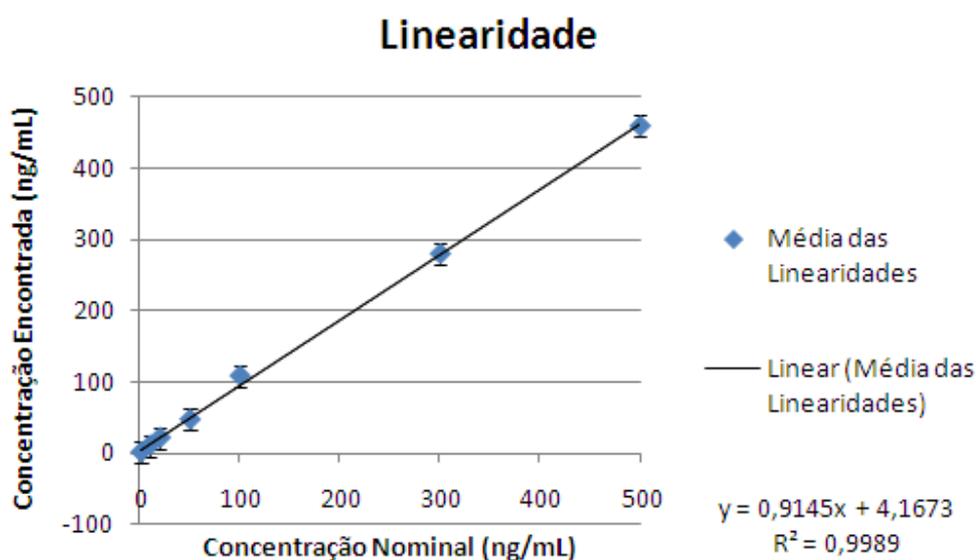


Figura 29 – Resultados da média das linearidades.

Tabela 3 – Equações da curva de calibração das três linearidades:

EQUAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO			
Equação da curva de calibração 1	$y = 0,0070314x +$	0,00112405	$r = 0,997056$
Equação da curva de calibração 2	$y = 0,00700969x +$	0,000441207	$r = 0,997472$
Equação da curva de calibração 3	$y = 0,00662828x +$	0,00155335	$r = 0,996869$

5.2.5 Precisão e exatidão

Na avaliação da precisão e exatidão foram analisadas quatro concentrações diferentes dentro da faixa de linearidade. Elas também foram analisadas dentro de um mesmo lote (intra-lote) e em lotes diferentes (inter-lotes).

5.2.5.1 Intra-lote

Para a avaliação da precisão e exatidão intra-lote foi utilizado um lote que continha uma curva de calibração e cinco controles de cada.

Para ser considerado aprovado, o coeficiente de variação (CV) dos controles de qualidade alto (CQA), médio (CQM) e baixo (CQB) não deve exceder 15% e para o LQ, não mais que 20%.

Os resultados para o plasma normal estão apresentados na Figura 30, para o plasma lipêmico na Figura 31 e para o hemolisado na Figura 32.

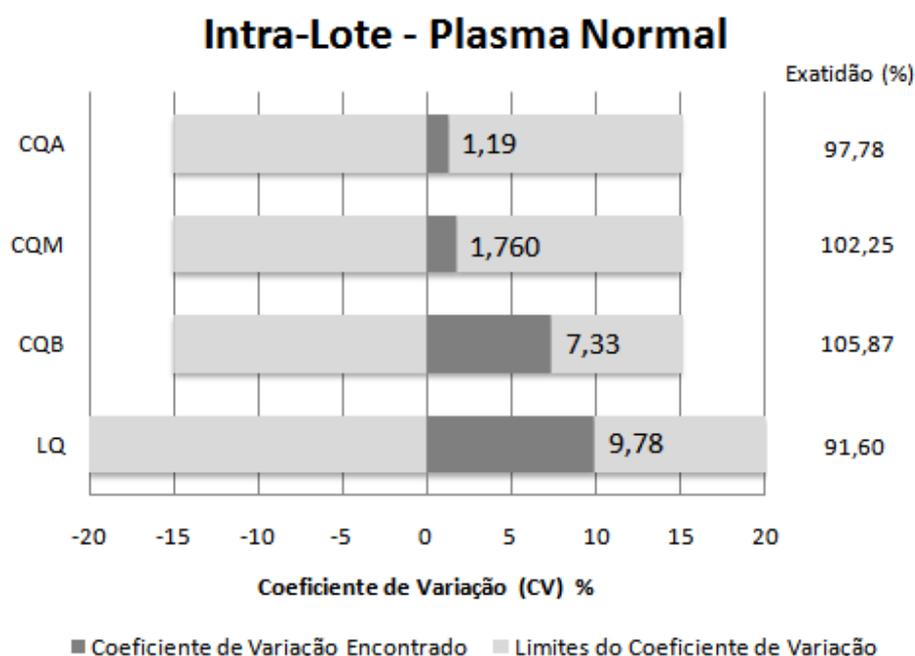


Figura 30 – Resultados das análises intra-lote em plasma normal.

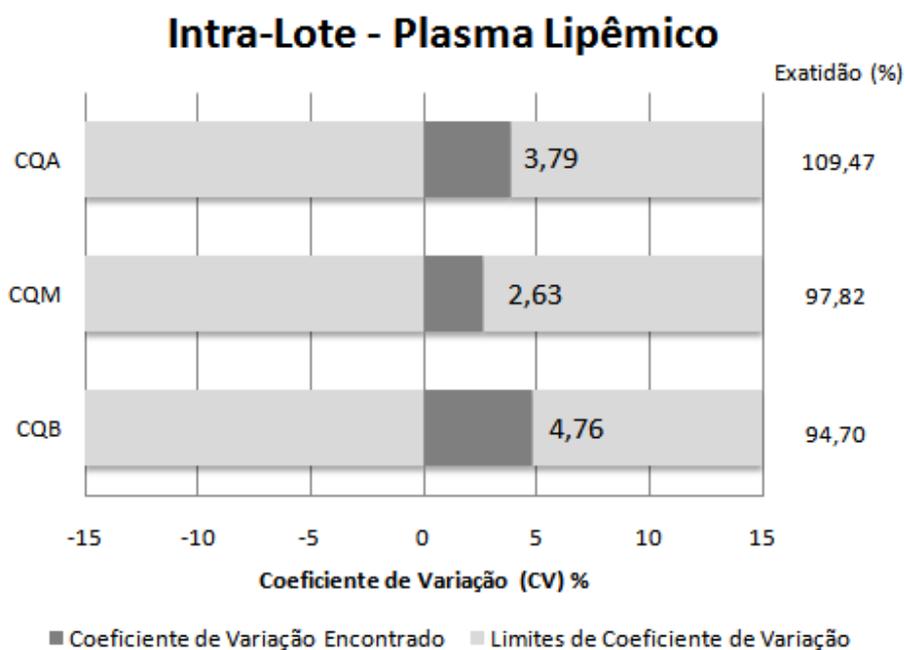


Figura 31 – Resultados das análises intra-lote em plasma lipêmico.

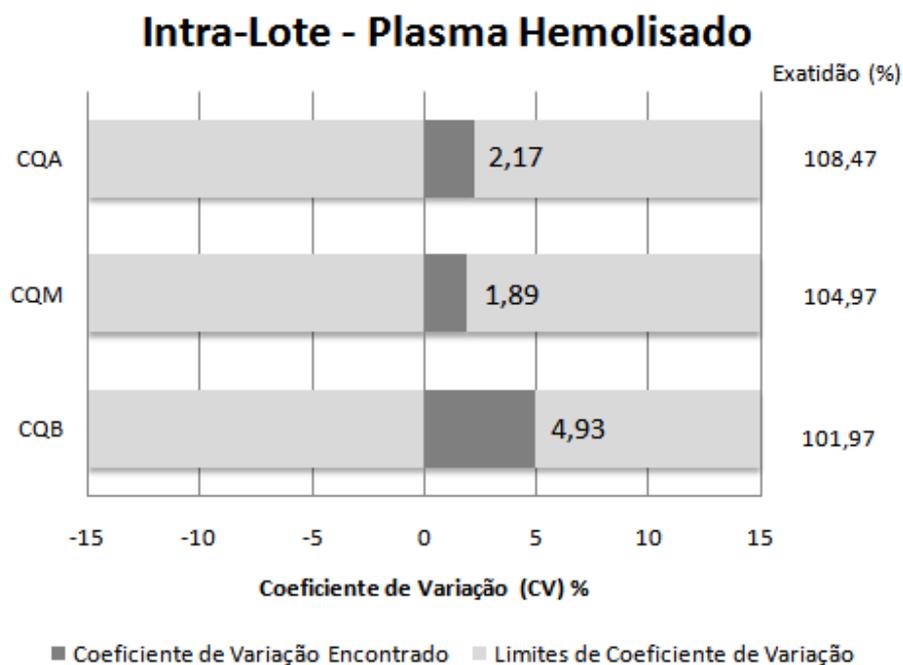


Figura 32 – Resultados das análises intra-lote em o plasma hemolisado.

5.2.5.2 Inter-lotes

Foram utilizados os mesmo critérios de avaliação da intra-lote.

Os resultados das análises inter-lote estão apresentados na Figura 33.

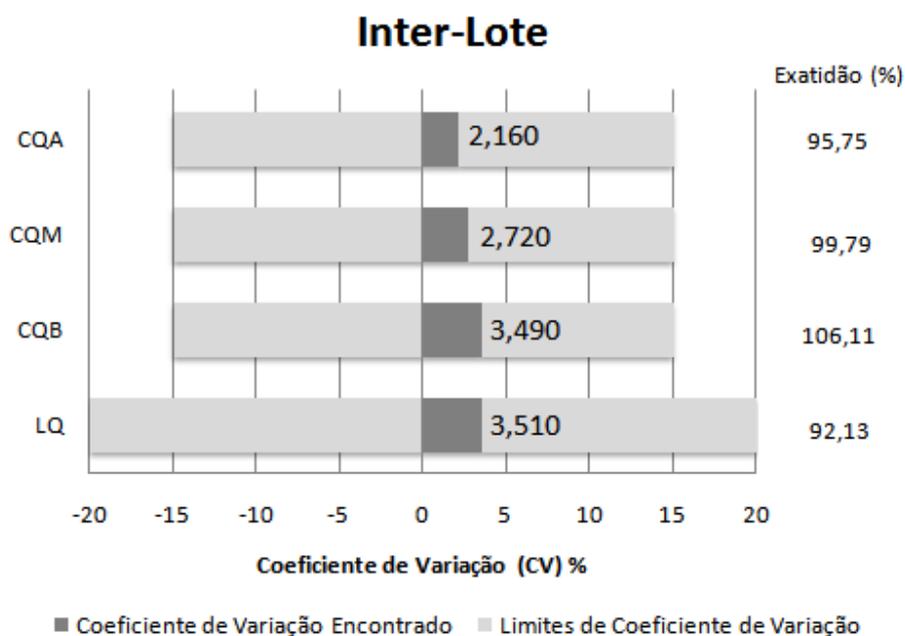


Figura 33 – Resultados das análises inter-lote.

5.2.6 Validação da diluição

A validação da diluição tem por finalidade garantir que pontos que acima do ponto mais alto da curva de calibração apresentem resultados precisos e exatos. Para avaliar isso, foram feitos controles de qualidades diluídos com plasma branco na proporção de 1:1 (v/v).

As Figuras 34 e 35 apresentam os resultados da exatidão intra e inter lote respectivamente. Avaliados pelos mesmos parâmetros da precisão e exatidão, podemos verificar que os resultados estão dentro dos limites aceitáveis.

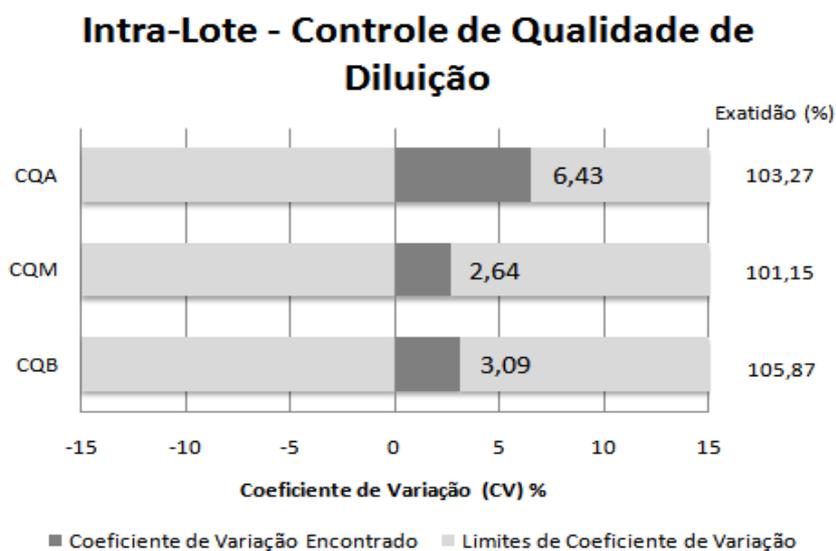


Figura 34 – Resultados das análises intra-lote.

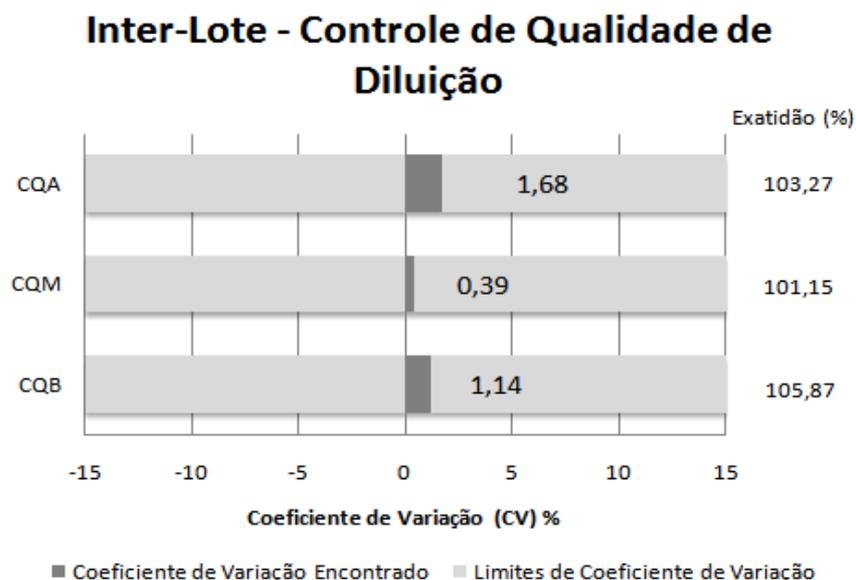


Figura 35 – Resultados das análises inter-lote.

5.2.7 Recuperação

A recuperação é calculada através da comparação das áreas dos picos do fármaco (controles de qualidade alto, médio e baixo) das amostras extraídas do plasma com as áreas dos picos do fármaco preparados em solução. O mesmo procedimento é feito para o padrão interno, onde foi utilizada uma solução de 250,0 ng/mL.

A Figura 36 demonstra a recuperação encontrada para o Zolpidem e o Diazepam.

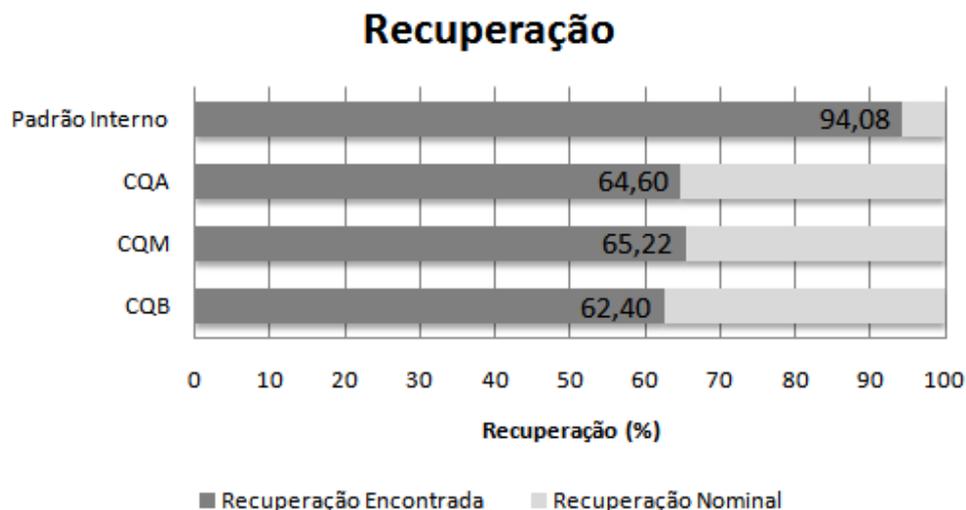


Figura 36 – Resultados da recuperação.

5.3 Estabilidades

Os critérios utilizados para a avaliação das estabilidades são os mesmos da precisão e exatidão.

5.3.1 Estabilidade de curta duração

5.3.1.1 Estabilidade no tempo e condições de análise

Para este teste, as amostras foram mantidas dentro do auto-injetor e mantidas a temperatura ambiente de 22,9°C, os controles de qualidade (CQA, CQM e CQB) foram analisados em triplicata nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas.

Os resultados apresentados na Figura 37, demonstra as variações dos controles de qualidades entre o tempo de 0 e 10 horas de análise.

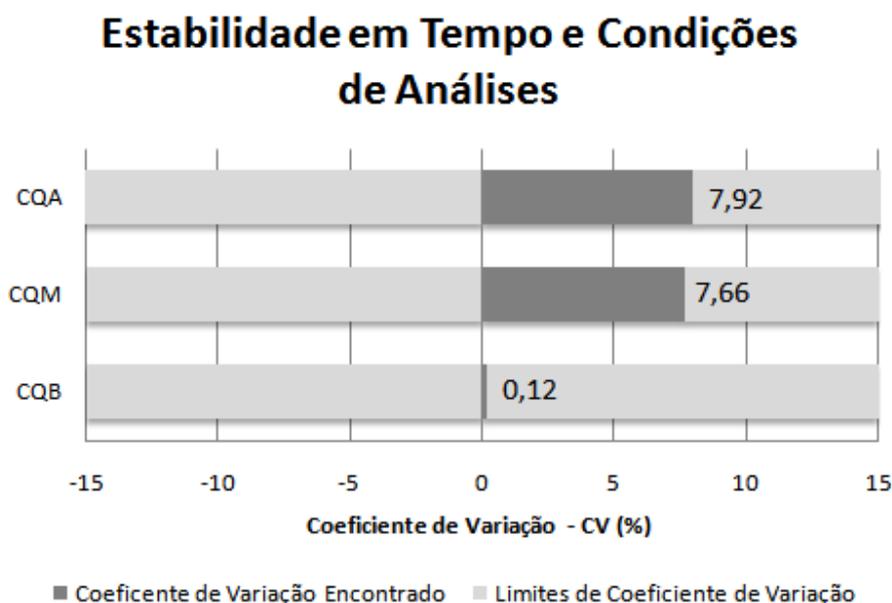


Figura 37 – Resultados da estabilidade em tempo e condições de análise entre o tempo 0 h e 10 h.

5.3.1.2. Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo

Para a avaliação da estabilidade do Zolpidem durante o congelamento e degelo da amostra, foram analisadas cinco amostras de cada controle de qualidade da seguinte maneira: as amostras foram congeladas a -70°C e mantidas por 24 horas, após isso elas foram submetidas ao descongelamento natural a temperatura ambiente, em seguida, extraídas e analisadas, caracterizando o degelo 1; o mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes, caracterizando o degelo 2 e 3.

Os resultados das variações das médias dos controles de qualidades para cada ciclo de degelo estão demonstrados na Figura 38.

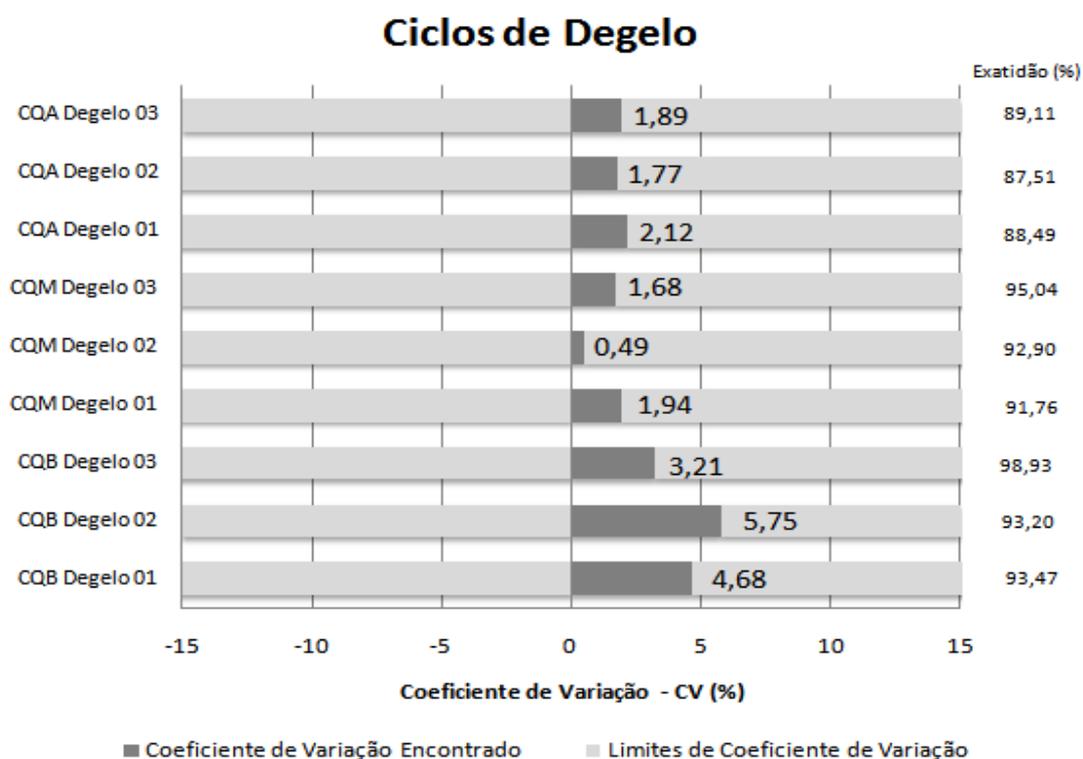


Figura 38 – Resultados da estabilidade entre os ciclos de degelo.

5.3.1.3 Estabilidade das amostras de plasma não processadas

Nesta estabilidade foram analisadas amostras de controle de qualidade recém-preparadas e outras após seis horas de bancada a temperatura ambiente. Os resultados das variações dos controles de qualidades estão demonstrados na Figura 39.

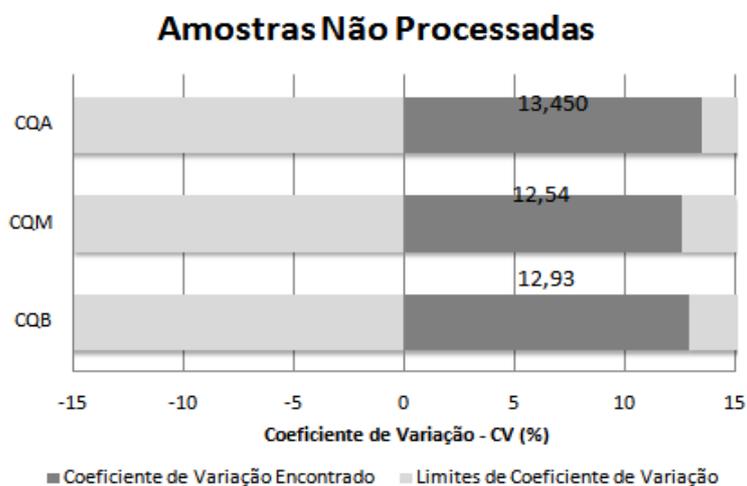


Figura 39 – Resultados da estabilidade das amostras não processadas.

5.3.1.4 Estabilidade de soluções padrão

Para a estabilidade das soluções padrão, foi utilizada uma solução de 100,0 ng/mL para o Zolpidem e Diazepam, elas foram analisadas recém-preparadas, após seis horas a temperatura ambiente e depois de sete dias de preparo armazenadas em geladeira, após isso foram comparadas as áreas dos picos do Zolpidem e Diazepam.

A variação encontrada nos controles de qualidade após essas três análises são demonstradas na Figura 40.

Estabilidade Soluções Padrão

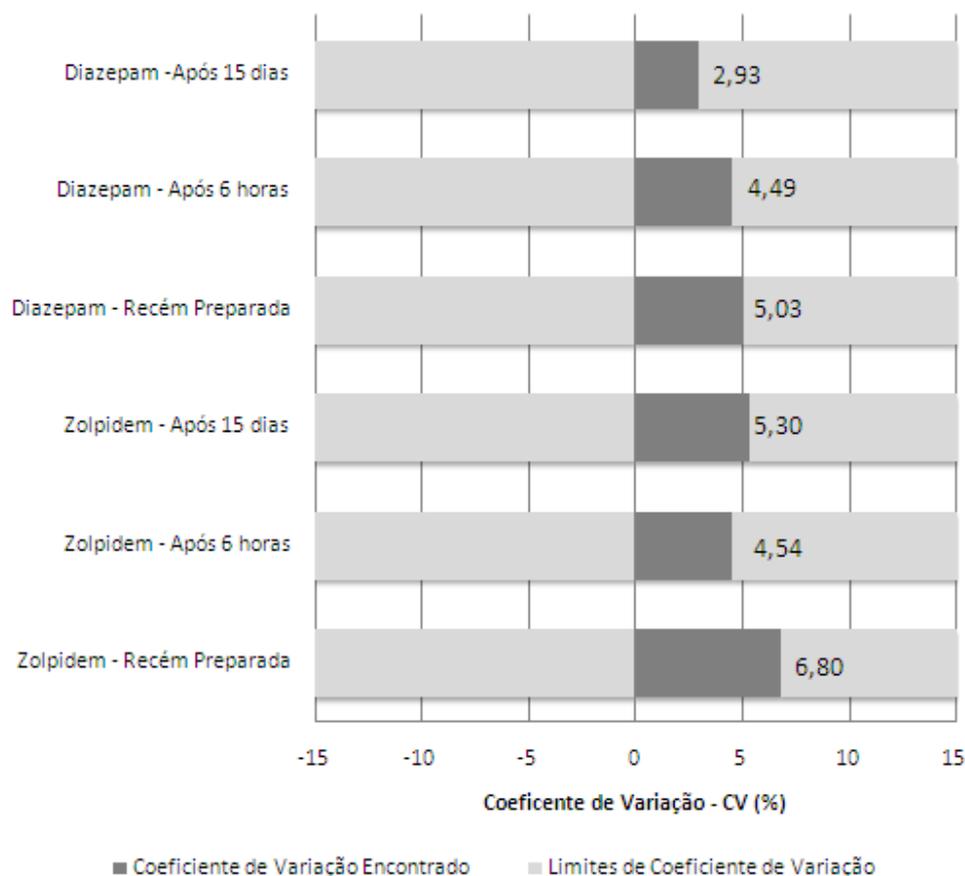


Figura 40 – Resultados da estabilidade das soluções padrão para Zolpidem e Diazepam.

5.3.1.5 Estabilidade de longa duração

Para a avaliação da estabilidade de longa duração, o tempo de armazenamento de exceder o intervalo de tempo que compreenda a primeira coleta de amostra, que foi em 07/09/07, e a análise da última amostra de voluntários, que foi em 25/03/08. Foram analisados os controles de qualidades após 201 dias de armazenamento a -70°C . Na Figura 41, esta demonstrada a variação dos controles de qualidade.

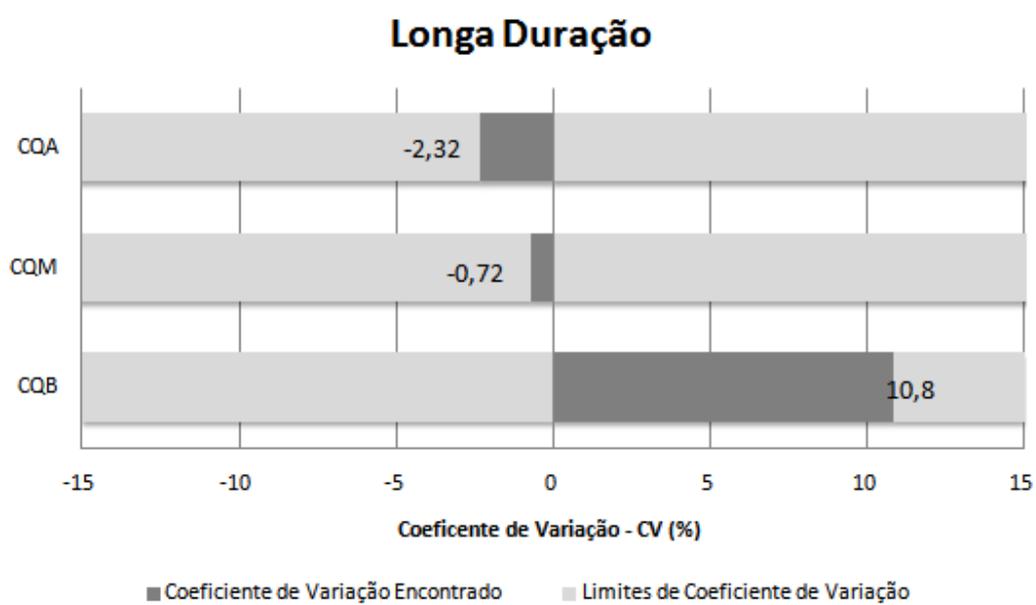


Figura 41 – Resultados da estabilidade de longa duração.

6. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida demonstrou-se adequada para análise de Zolpidem em plasma humano. Durante a validação pode ser verificado que a extração se mostrou eficiente para a extração de Zolpidem em plasma humano. Como em estudos de farmacocinética e bioequivalência são analisadas muitas amostras, necessita-se de um método rápido, e com o tempo tal de 2,00 minutos de corrida esse se demonstrou adequado.

A validação da metodologia preencheu todos os critérios estabelecidos pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Na seletividade não ocorreram interferências nos tempos de retenção do fármaco ou estas foram menores que 20% da resposta do padrão LQ e para o padrão interno foram menores que 5% que a concentração utilizada nos teste. Quanto a sensibilidade, a menor concentração da curva de calibração foi aceito com um CV < 20%. Para a precisão o coeficiente de variação (CV) encontrado para os controles de qualidade CQB, CQM e CQA foram inferiores ou iguais a 15% e inferiores ou iguais a 20% para o controle de qualidade LQ. No caso da exatidão, foi encontrado para o controle de qualidade LQ e para os controles de qualidade CQB, CQM e CQA apresentaram valores compreendidos dentro do desvio de $\pm 20\%$ e $\pm 15\%$, respectivamente, em relação ao valor nominal.

Para as estabilidades no tempo e condições de análise, os resultados obtidos estão inferiores ao desvio permitido de $\pm 15\%$ para os três controles de qualidade analisados e, portanto, as amostras permaneceram estáveis dentro do auto-injetor durante o período de 10 horas. Durante a estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo, foram analisados controles de qualidade, diante disso o Zolpidem analisado no plasma humano é estável nos três ciclos de congelamento e degelo quando armazenadas a -70°C pois os CV se mostraram inferiores ao permitido na legislação. A estabilidade das amostras de plasma não processadas, após 6 horas a temperatura ambiente foi verificado que sua variação não foram superiores a 15%, sendo assim, as amostras permaneceram estáveis.

Conclui-se que esse método é adequado para a análise de Zolpidem em plasma humano, visto que o mesmo cumpriu todos os parâmetros estabelecidos pela legislação vigente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Pró Genéricos. Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos.** Disponível em <www.progenericos.org.br>. Acesso em 30 de agosto de 2009 a 20 horas.
2. BRASIL. **Resolução RDC nº135.** A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Regulamento Técnico Para Medicamentos Genéricos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 29 mai. 2003
3. BRASIL. LEI Nº 9.787. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 11 fev. 1999.
4. GODMAN E GILMAN. **As Bases Farmacológicas Da Terapêutica.** Décima edição. Editora McGraw-Hill, 2005.
5. **Food and Drug Administration (FDA).** Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/022196lbl.pdf> Acesso em 26 de agosto a 22 horas.
6. AZEVEDO, A. P.; ALÒE, F.; HASAN, R.**Hipinóticos.** Neurociências.Vol. 12, N 4, 2004.
7. KOONO, E. E. M. **Avaliação De Bioequivalência De Comprimidos Contendo 500 mg De Tinidazol.** Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos. Universidade de São Paulo. São Paulo/SP. 2005.
8. PEREIRA, A. S.; BICALHO, B.; LILLA, S.; NUCCI, G.; **Desafios Da Química Analítica Frente Às Necessidades Da Indústria Farmacêutica.** Química Nova, Vol. 28, Suplemento, S107-S111, 2005.
9. HARRIS, D.C.; **Análise Química Quantitativa.** Sexta Edição. Editora LTC. 2003.
10. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; **Desenvolvimento De Métodos Por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação.** Editora da Ufscar. 2001.
11. BRASIL. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade/Bioequivalência.** Volume II. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2002a
12. THOMSON, J. J.; **Rays of positive electricity and their application to chemical analyses.** longmans Green, Londres, 1913.

13. NANDAKUMAR, R.; MADAYIPUTHIYA, N.; FOUAD, A. F.; ***Proteomic analysis of endodontic infections by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.*** *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24: 347–352.
14. MEURER, E. C.; **Técnicas Modernas em Espectrometria de Massas: Aplicações Analíticas e no Estudo de Reações Íon/Molécula na Fase Gasosa.** Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2003.
15. CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. **Espectrometria De Massas Com Ionização Por “Electrospray”:** Processos Químicos Envolvidos Na Formação De Íons De Substâncias Orgânicas De Baixo Peso Molecular. *Química Nova*, Vol. 29, No. 2, 287-292, 2006.
16. FENN, J. B.; WHITEHOUSE, G. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M. H.; ***Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers.*** *Anal. Chem.* 1985, 57, 675-679.
17. MILLE, P. E.; DENTON, M. B.; ***The Quadrupole Mass Filter: Basic Operating Concepts.*** University of Arizona, Tucson. Vol. 63; n 7; 1986.
18. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica De Compostos Orgânicos.** Sétima Edição. Editora LTC. 2007.
19. 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.** *Química Nova*, Vol. 31, No. 3, 623-636, 2008.
20. QUINTELA, O.; SAUVAGE, F.; CHARVIER, F.; GAULIER, J.; LACHÂTRE, G.; MARQUET, P.; ***Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Detection of Low Concentrations of 21 Benzodiazepines, Metabolites, and Analogs in Urine: Method with Forensic Applications.*** *Clinical Chemistry* 52:7, 1346-1355. 2006.
21. [LALOUP, M.](#); [RAMIREZ, F. M. M.](#); [DE BOECK, G.](#); [WOOD, M.](#); [MAES, V.](#); [SAMYN, N.](#); ***Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites,***

- zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair.* [J Anal Toxicol](#). 2005 Oct;29(7):616-26.
22. KINTZ, P.; VILLAIN, M.; LUDES, B.; **Testing for zolpidem in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B*, 811 59–63. 2004.
23. CONCHEIRO, M.; CASTRO, A.; QUINTELA, O.; CRUZ, A.; LOPEZ-RIVADULLA, M.; **Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.** *Anal Bioanal Chem* 391:2329–2338. 2008.
24. [MARESOVA, V.](#); [CHADT, J.](#); [NOVAKOVA, E.](#); **Screening and semiquantitative analysis of drugs and drugs of abuse in human serum samples using gas chromatography-mass spectrometry.** [Neuro Endocrinol Lett](#). 2008 Oct;29(5):749-54.
25. GIROUND, C.; AUGSBURGER,; MENETRY, A.; MANGIN, P.; **Determination of zaleplon and zolpidem by liquid chromatography–turbo-ion-spray mass spectrometry: application to forensic cases.** *Journal of Chromatography B*, 789 131–138. 2003.
26. BHATT, J.; JANGID, A.; SHETTY, R.; SHAH, B.; KAMBLI, S.; SUBBAIAH, G.; SINGH, S.; **Quantification of zolpidem in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Biomedical Chromatography*. 20: 736–742. 2006.
27. COUTURE, J.; JOBIN, I.; VALLÉE, F.; **Determination of Zolpidem in Human EDTA Plasma by LC/MS/MS.** Anapharm Inc., Sainte-Foy, PQ, Canada.
28. ISHIDA, T.; KUDO, K.; HAYASHIDA, M.; IKEDA, N.; **Rapid and quantitative screening method for 43 benzodiazepines and their metabolites, zolpidem and zopiclone in human plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with a small particle column.** *Journal of Chromatography B*. 877 2652–2657. 2009.
29. [LALOUP, M.](#); [RAMIREZ, F. M. M.](#); [DE BOECK, G.](#); [WOOD, M.](#); [MAES, V.](#); [SAMYN, N.](#); **Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method**

- for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair.* [*J Anal Toxicol.*](#) 2005 Oct;29(7):616-26.
30. [STANKE, F.](#); [JOURDIL, N.](#); [BESSARD, J.](#); [BESSARD, G.](#); **Simultaneous determination of zolpidem and zopiclone in human plasma by gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection.** [*J Chromatogr B Biomed Appl.*](#) 1996 Jan 12;675(1):43-51.
31. GUNNAR, T.; MYKKANEN, S.; ARINIEMI, K.; LILLSUNDE, P.; **Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection.** *Journal of Chromatography B*, 806 205–219. 2004.
32. HEGSTAD, S.; KHIABANI, HZ.; KRISTOFFERSEN, L.; KUNØE, N.; LOBMAIER, PP.; CHRISTOPHERSEN, AS. **Drug screening of hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J Anal Toxicol.* 2008 Jun;32(5):364-72.
33. VILLAIN, M.; CONCHEIRO, M. CIRIMELE, V.; KINTZ, P.; **Screening method for Benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B*, 825 72–78. 2005.
34. HOPKINS, S. C.; NOFSINGER, J. B.; ALLEN, M. S.; KOCH, P.; VARNEY, A. **In Vivo Saturation Binding of GABA-A Receptor Ligands to Estimate Receptor Occupancy Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.** *Biopharmaceutics & Drug Disposition.* 30: 9–20. 2009.
35. BRASIL. **Resolução RDC nº10.** A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 02 jan. 2001.
36. BRASIL. **Resolução RDC nº133.** A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Regulamento Técnico para Medicamento Similar”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 16 abr. 1999.

37. MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; **O Estado e a Arte da Cromatografia Líquida De Ultra Eficiência**. Química Nova, Vol. 32, No. 1, 214-222, 2009.
38. BRASIL. **Resolução RE nº899**, de 29 de maio de 2004. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 02 jun. 2003a.
39. LEITE, F.; **Validação Em Análise Química**. Quarta Edição. Editora Átomo. 2002.
40. LANÇAS, F. M.; **Validação De Métodos Cromatográficos De Análise**. Editora Rima. 2004.
41. The *Merk Index* em CD-ROM. Versão 12:2.
42. MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L.; **Espectrometria De Massas Com Ionização Por “Electrospray” Aplicada Ao Estudo De Espécies Inorgânicas E Organometálicas**. Química Nova. Vol. 26, No. 4, 556-563, 2003.
43. FACCHIN, I.; PASQUINI, C.; **Extração Líquido-Líquido Em Sistemas de Fluxo**. Química Nova. 21(1) (1998).
44. SOUZA, C. E. M.; **Desenvolvimento E Validação De Métodos Bioanalíticos Para A Quantificação De Hidroclotiazida Cimetidina Em Plasma Humano E Aplicação Em Estudos De Farmacocinética Comparada**. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2008.
45. BRASIL. **Resolução RE nº1170**, de 19 de abril de 2006. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova “Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 24 abr. 2006.
46. BRASIL. **Esclarecimentos Sobre a Aplicação da RE nº899/2003 – Validação de Métodos Bioanalíticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, jun. 2008.
47. MEURER, E. C.; **Espectrometria De Massas Pentaquadrupolar e Suas Aplicações Analíticas, Sintéticas e em Medidas Termodinâmicas**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2000.