UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência

Thiago Branco Hanna

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Thiago Branco Hanna
Orientadora: Profª. Drª. Cristiane Masetto de Gaitani

Ribeirão Preto
2010

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.

Hanna, Thiago Branco

Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, 2010.

57 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:

Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profª. Drª. Cristiane Masetto de Gaitani.

1. Mesilato de Imatinibe. 2. Perfil *in vitro* de dissolução.
3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Branco Hanna

Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador(a): Profª. Drª. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este aos meus pais, Raider e Conceição, ao meu irmão Matheus, à minha namorada Lívia e a toda minha família, em especial, a de Ribeirão Preto, por seu apoio, respeito, amor e carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as experiências proporcionadas, permitindo meu crescimento e amadurecimento emocional e espiritual.

À Profª Drª Cristiane Masetto de Gaitani, pela orientação sempre presente, pelos valiosíssimos conhecimentos passados, por me mostrar a importância de um trabalho bem feito, por sua amizade, carinho e compreensão a todo o momento e, sobretudo, por ter acreditado em meu potencial.

Aos meus pais, Raider e Conceição, por seu amor, carinho e apoio incondicionais, por proporcionarem-me sempre o melhor, por incentivarem-me a prosseguir, por sempre acreditarem em meu potencial, e, sobretudo, por serem meus guias, minhas referências.

Ao meu irmão Matheus, por seu amor e por mostrar-me o valor da simplicidade e a importância da humildade.

Aos meus avós, José e Maria (*in memoriam),* por me acolherem com muito amor.

Às minhas tias Teh e Rita pelos bons momentos, pelo carinho e amizade.

Aos meus tios, Ebinho e Jusi por seu amor, carinho e apoio e por me ajudarem na transposição de vários obstáculos.

Às minhas primas Amanda e Camila pelos divertidíssimos momentos passados juntos.

À minha namorada Lívia por seu amor, carinho e compreensão, por estar sempre presente, por sua disposição em ajudar-me, pelos ótimos momentos passados e por me dar forças pra buscar o melhor.

À Profª Drª Fabíola Attié de Castro por, gentilmente, ceder o padrão analítico do fármaco e os comprimidos mesilato de imatinibe.

À Profª. Drª. Juliana Maldonado Marchetti, por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório.

À Profª. Drª. Maria Vitória Badra Bentley, por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório.

Aos amigos e parceiros de Laboratório: Fernando, Tatiana, Éllen, Bruna, Alyne, Luriene e Jennifer, pelos ótimos momentos passados juntos, pelos ensinamentos, dicas e conselhos e, sobretudo, pela amizade.

Aos técnicos Luíz Fernando, Jabor, Maíra, Ivelize, José Orestes e Henrique por me auxiliarem no trabalho e por tornarem-no mais divertido.

Aos amigos e companheiros de jornada: Leandro C., Rodrigo M., Silvinha, Rodrigo S., Rafael, Samantha, Marina, Thiago, Vanessa e Marcela por dicas, ensinamentos, apoio e, sobretudo, pela amizade de todos.

Aos grandes amigos Leandro Zeh, Carlos e Moretti, por seu companheirismo e amizade.

Aos meus amigos de infância, David, Fauze, Hanna, César, Pedro, Renata, Jefferson e Jiovanni por todos os momentos juntos.

Aos amigos Matheus, Marici e Tatiana que, embora tenham tomado outro caminho, continuam no coração.

À todos aqueles que não foram citados e que fazem ou fizeram parte da minha vida em algum momento e que eu pude chamar de amigo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, ao Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas e à CAPES pelo apoio financeiro.

“É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.”

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

Resumo..... i
Abstract..... ii
Lista de figuras..... iii
Lista de tabelas..... v
Lista de quadros..... vi

1 – Introdução..... 1
1.1 – Dissolução..... 1
1.1.1 – Cinética de ordem zero..... 5
1.1.2 – Cinética de primeira ordem..... 6
1.2 – Leucemia mielóide crônica..... 7
1.3 – Mesilato de imatinibe..... 10
2 – Objetivos..... 14
3 – Material e métodos..... 15
3.1 – Equipamentos..... 15
3.2 – Reagentes e solventes..... 16
3.3 – Soluções-padrão..... 16
3.4 – Comprimidos de Glivec® (mesilato de imatinibe)..... 17
3.5 – Determinação do espectro de absorção do mesilato de imatinibe. 17
3.6 – Análise cromatográfica..... 18
3.7 – Validação..... 19
3.7.1 – System suitability..... 20
3.7.2 – Calibração e linearidade..... 20
3.7.3 – Precisão e exatidão..... 20
3.7.4 – Limite de quantificação..... 22
3.7.5 – Robustez..... 23
3.7.6 – Seletividade..... 24
3.7.7 – Estabilidade..... 25
3.8 – Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos..... 25
3.9 – Determinação da eficiência de dissolução..... 26
3.10 – Análise estatística..... 27
4 – Resultados e discussão..... 28
4.1 – Determinação do espectro de absorção do mesilato de imatinibe. 28
4.2 – Análise cromatográfica..... 30
4.3 – Validação do método analítico..... 35

4.3.1 – System suitability..... 36
4.3.2 – Calibração e linearidade..... 37
4.3.3 – Precisão intra e inter-ensaio..... 38
4.3.4 – Exatidão intra e inter-ensaio..... 39
4.3.5 – Limite de quantificação..... 39
4.3.6 – Robustez..... 40
4.3.7 – Seletividade..... 41
4.3.8 – Estabilidade..... 42
4.4 – Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos..... 43
5 – Conclusão..... 49
6 – Referências bibliográficas..... 50

Hanna, T. B. **Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência** 2010. 57f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010

RESUMO

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença cujo marcador molecular é o rearranjo gênico BCR/ABL, original da translocação t(9;22), conhecida como cromossomo Philadelphia. Recentemente, os inibidores da enzima tirosina-quinase têm sido estudados e utilizados para o tratamento da LMC. Nesta classe, está o Mesilato de Imatinibe, uma pequena molécula que inibe competitivamente a BCR/ABL tirosina quinase, impedindo sua atividade. Por não possuir monografia publicada em compêndios oficiais, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato em diferentes condições. A quantificação do fármaco foi feita utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e as análises foram realizadas em uma coluna C18 Gemini Phenomenex®, utilizando como fase móvel tampão acetato de sódio 10,7 mmol/L, pH 3,0:metanol (40:60 v/v). O método foi validado e apresentou-se linear no intervalo de concentração de 10-150 µg/mL (r=0,9993). Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 2,0 % e a exatidão próxima de 100 %. Também foram avaliados os parâmetros seletividade, robustez, estabilidade e limite de quantificação (10 µg/mL). A avaliação do perfil *in vitro* de dissolução foi realizada em três diferentes meios de dissolução (HCl 0,1 N, tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão fosfato de potássio monobásico pH 6,8), três velocidades de agitação (50, 75 e 100 rpm) e dois tipos de aparatos (pá e cesta). Os resultados obtidos neste teste indicaram que a forma farmacêutica em estudo é de liberação imediata, uma vez que foi verificada liberação de grande quantidade do fármaco em um curto período de tempo. A comparação dos perfis de dissolução, realizada através do cálculo da eficiência de dissolução, apresentou diferenças em relação à porcentagem do fármaco liberado. a condição mais adequada para avaliar o perfil *in vitro* de dissolução é o meio de dissolução HCl 0,1 N, aparato da pá e velocidade de agitação de 75 ou 100 rpm.

Hanna, T. B. **Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência** 2010. 57f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a disease whose molecular marker is the BCR/ABL, original of the translocation t (9; 22), known as the Philadelphia chromosome. Recently, inhibitors of the enzyme tyrosine kinase have been studied and used for the treatment of CML. In this class, is the Imatinib mesylate, a small molecule that competitively inhibits BCR/ABL tyrosine kinase, preventing its activity. To do not have a monograph published in official compendia, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* dissolution of tablets mesylate in different conditions. The quantification of the drug was made using high performance liquid chromatography on reversed phase (RP-HPLC) and analysis was performed on a Phenomenex® Gemini C18 column using a mobile phase of sodium acetate buffer 10.7 mmol/L pH 3.0:methanol (40:60 v/v). The method was validated and presented in a linear concentration range of 10-150 µg/mL (r = 0.9993). The coefficients of variation obtained were below 2.0% and accuracy near 100%. We also evaluated the parameters selectivity, robustness, stability and limit of quantification (10 µg/mL). The evaluation of in vitro dissolution was conducted in three different dissolution media (0.1 N HCl, sodium acetate buffer pH 4.5 and potassium phosphate monobasic buffer pH 6.8), three agitation speeds (50, 75 and 100 rpm) and two types of devices (paddle and basket). The results of this tests indicated that the pharmaceutical form in question is immediate release, since it was observed release of large amounts of the drug in a short period of time. The comparison of dissolution profiles, conducted by calculating the dissolution efficiency, showed differences compared to the percentage of drug released. The best conditions to evaluate the in vitro profile of dissolution is the dissolution medium 0.1 N HCl, paddle apparatus and stirring speed of 75 or 100 rpm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Mesilato de imatinibe..... 11

Figura 2. Espectro de absorção do mesilato de imatinibe na concentração de 100 µg/mL em a - metanol; b – tampão borato de sódio 0,1 mol/L pH 9,1; c – tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L pH 3,0..... 28

Figura 3. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (74:1:25, v/v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 30

Figura 4. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (64:1:35, v/v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 31

Figura 5. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: água:trietilamina pH 2,4 (acertado com ácido ortofosfórico):metanol 45:1:54 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 31

Figura 6. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:acetonitrila (35:65 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 32

Figura 7. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:metanol (35:65 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 33

Figura 8. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:metanol (30:70 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 33

Figura 9. **Análise do mesilato de imatinibe:** Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 3,0: metanol (35:65 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 34

Figura10. **Análise do mesilato de imatinibe**: Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 10,6:metanol (40:60 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 34

Figura 11. Gráfico de calibração para análide do mesilato de imatinibe no intervalo de concentração de 10 µg/mL a 150 µg/mL, referente à linearidade..... 37

Figura 12. Seletividade do método para análise do mesilato de imatinibe. a – fase móvel e meio de dissolução (HCl 0,1 N pH 1,2), b – padrão de mesilato de imatinibe em meio de dissolução. Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 10,6:metanol (40:60 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm..... 42

Figura 13. Perfil de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe (100 mg). Velocidade de agitação: 50 rpm. Os valores correspondem à média de três determinações e as barras representam o desvio padrão..... 45

Figura 14. Perfil de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe (100 mg). Velocidade de agitação: 75 rpm. Os valores correspondem à média de três determinações e as barras representam o desvio padrão..... 45

Figura 15. Perfil de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe (100 mg). Velocidade de agitação: 100 rpm. Os valores correspondem à média de três determinações e as barras representam o desvio padrão..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica..... 2

Tabela 2. Métodos para quantificação do mesilato de imatinibe encontrados na literatura..... 12

Tabela 3. Composição das fases móveis testadas para análise do mesilato de imatinibe..... 18

Tabela 4. Preparo das soluções para a exatidão..... 22

Tabela 5. Fatores avaliados na determinação da robustez..... 23

Tabela 6. Condições utilizadas para o teste de dissolução *in vitro* de comprimidos de mesilato de imatinibe..... 25

Tabela 7. Condições cromatográficas para análise do mesilato de imatinibe..... 35

Tabela 8. Parâmetros cromatográficos obtidos para análise do mesilato de imatinibe..... 35

Tabela 9. Resultados do *system suitability* para análise do mesilato de imatinibe..... 36

Tabela 10. Precisão do método para análise do mesilato de imatinibe..... 38

Tabela 11. Exatidão do método para análise do mesilato de imatinibe..... 39

Tabela 12. Limite de quantificação para análise do mesilato de imatinibe..... 40

Tabela 13. Valores de coeficiente de correlação linear e erro experimental da robustez..... 40

Tabela 14. Valores de influência para cada parâmetro..... 41

Tabela 15. Avaliação da estabilidade do mesilato de imatinibe..... 43

Tabela 16. Valores de ED% para os comprimidos de mesilato de imatinibe obtidos com o aparato da pá..... 47

Tabela 17. Valores de ED% para os comprimidos de mesilato de imatinibe obtidos com o aparato da cesta..... 47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição dos fatores seguindo o teste de Youden..... 24

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Dissolução

Fisicoquimicamente, a dissolução é um processo pelo qual uma substância sólida penetra em um solvente, formando uma solução (KRÄMER, 2005). Num sentido mais amplo, a dissolução pode ser mais corretamente descrita como um ensaio físico para prever a liberação de uma substância em uma área e quantidade adequadas e no tempo correto. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico libera, podendo se admitir a incorporação de substâncias que permitem alterar a solubilidade do fármaco no meio (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Em 1897, Noyes e Whitney estabeleceram, com base na segunda lei de difusão de Fick, a relação entre a velocidade de dissolução, a solubilidade máxima do soluto (ou constante de saturação) e a concentração ao tempo *t* (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002) (**Equação 1**).

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C_t) \quad (1)$$

Onde: $\frac{dC}{dt}$ = velocidade de dissolução; K= coeficiente de dissolução ou transferência de massa; C_s = solubilidade máxima no meio de dissolução e C_t = concentração ao tempo *t*.

Em 1904, Nernst e Brunner modificaram a equação de Noyes e Whitney, tendo incluído como parâmetros influentes no processo o coeficiente de difusão (*D*), a área de superfície (*S*), a espessura da camada de difusão (*h*) e o volume do meio de dissolução(*V*) (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002) (**Equação 2)**.

$$\frac{dC}{dt} = K\,\frac{DS}{Vh}(C_s - C_t) \qquad (2)$$

Esta é a teoria da velocidade de dissolução com maior aceitação e dela se constata que quando o volume do meio de dissolução é suficientemente grande de modo que $t << C_s$ (normalmente <10%), considera-se que a concentração do soluto no solvente não afeta a velocidade de dissolução (MANADAS; PINA, VEIGA, 2002).

A biodisponibilidade é um requisito chave para qualquer fármaco administrado por via oral ser efetivo sistemicamente (KRÄMER, 2005). Baseado na solubilidade e permeabilidade do fármaco, o seguinte sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) (AMIDON *et al.*, 1995) (**Tabela 1**) é recomendado:

Tabela 1 – Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Caso I	Alta Solubilidade (AS) e Alta Permeabilidade (AP)
Caso II	Baixa Solubilidade (BS) e Alta Permeabilidade (AP)
Caso III	Alta Solubilidade (AS) e Baixa Permeabilidade (BP)
Caso IV	Baixa Solubilidade (BS) e Baixa Permeabilidade (BP)

O SCB pode auxiliar na previsão da absorção *in vivo* e identificar se a biodisponibilidade de determinado produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou da concentração do fármaco (DRESSMAN *et al.*, 1998; KASSIN *et al.*, 2003; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Para que um fármaco seja absorvido a partir de uma forma farmacêutica sólida, é necessário que ocorra sua liberação, dissolução ou solubilização, sob condições fisiológicas, e que seja permeável através do trato gastrintestinal (FDA, 1997).

A liberação do fármaco a partir de uma forma farmacêutica sólida pode envolver três etapas fundamentais: desintegração, desagregação e, finalmente, dissolução. Esses processos podem ocorrer simultaneamente, com a conseqüente liberação do fármaco da forma farmacêutica. A velocidade pela qual o processo de dissolução ocorre, determinará, portanto, a liberação do fármaco e sua absorção. Em função disso, os estudos de dissolução *in vitro* tornaram-se fundamentais para assegurar a qualidade das formulações na forma sólida de uso oral, bem como para permitir a otimização das mesmas quando em desenvolvimento (SERRA; STORPIRTIS, 2004).

Os ensaios de dissolução *in vitro* são utilizados para garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações (BRASIL, 2002).

Existem três categorias de ensaios de dissolução para medicamentos de liberação imediata, os quais permitem avaliar e comparar a cinética e eficiência de dissolução de um determinado produto: ensaio de dissolução de um único ponto, ensaio de dissolução de dois pontos e perfis de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

O perfil de dissolução é avaliado através dos ensaios de dissolução e relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo (ABDOU, 1989) e representa uma técnica relativamente rápida e barata para avaliar formas farmacêuticas sólidas antes do teste clínico. Permite, também, a obtenção de parâmetros cinéticos, que são importantes para determinar a eficiência do processo, além do tempo necessário para que determinadas porcentagens do fármaco se dissolvam, possibilitando, desta forma, conclusões a respeito das características biofarmacêuticas *in vitro* de determinada formulação (STORPIRTIS, 1999) (AGUIAR

et al., 2005). Entretanto, a grande dificuldade está em comparar os perfis de dissolução obtidos (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

Há vários métodos propostos para avaliação comparativa entre perfis de dissolução:

- métodos baseados na análise de variância: que determinam, através de repetidos ensaios, as fontes de variação (tempo, produto e interação entre tempo *versus* produto) (YUKSEL; KANIK; BAYKARA, 2000; COSTA; LOBO, 2001);

- métodos modelo independente: destacam-se os testes combinados, onde comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvido em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência;

- métodos modelo dependente: baseados em funções matemáticas distintas que, após seleção de uma ferramenta adequada, permitem avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos métodos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: ordem zero, primeira ordem, Weibull, Higuchi, entre outros. Todos esses modelos são empregados para reduzir dimensões dos dados observados para um número mínimo de parâmetros (SERRA; STORPIRTIS, 2007; ADAMS *et al.*, 2001; POLLI; REKHI; SHAH, 1996; O'HARA *et al.*, 1998).

Modelos que se fundamentam em estudos da cinética de dissolução possibilitam conclusões a respeito do processo de dissolução de uma determinada formulação, uma vez que permitem conhecer: a velocidade do processo; a

quantidade máxima dissolvida e pontos nos quais podem ocorrer mudanças significativas (SERRA; STORPIRTIS, 2007; O'HARA *et al.*, 1998; POLLI; REKHI; SHAH, 1996; MOORE; FLANNER, 1996). Nesse tipo de análise, avalia-se a quantidade de fármaco dissolvido em diferentes intervalos de tempo, obtendo-se um perfil definido por tempo *versus* porcentagem de fármaco dissolvida (SERRA; STORPIRTIS, 2007; O'HARA *et al.*, 1998; POLLI; REKHI; SHAH, 1996; CID, 1981).

1.1.1 - Cinética de ordem zero

A dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas que não desagregam e que liberam o fármaco lentamente, desde que a sua área não se modifique e que não se atinjam condições de equilíbrio, pode ser representada pela **Equação 3** (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

(3) $$W_0 - W_t = K_t$$

Onde, W_0 = quantidade de fármaco inicialmente presente na forma farmacêutica; W_t = quantidade de fármaco presente na forma farmacêutica após o tempo *t* e *K* = constante de proporcionalidade.

Esta equação pode ser transformada na seguinte (**Equação 4**):

(4) $$f_t = K_0 t$$

Onde: f_t = 1-(W_t-W_0) a fração de fármaco dissolvida no tempo t e K_0 = constante aparente de dissolução ou constante aparente de ordem zero (COSTA; LOBO, 2001).

Assim, desde que as condições já referidas se mantenham, o gráfico da fração de fármaco não-dissolvido versus tempo será linear (VARELAS; DIXON; STEINER, 1995). Sistemas de liberação modificada, como comprimidos matriciais, seguem este modelo cinético (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, o qual é o modelo ideal para as formas farmacêuticas de liberação prolongada (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). A **Equação 5** representa este modelo.

(5) $$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

Onde, Q_t é a quantidade de fármaco dissolvido ao tempo *t*, Q_0 é a quantidade inicial de fármaco dissolvido na solução (a maioria das vezes $Q_0 = 0$) e K_0 é a constante de liberação de ordem zero.

1.1.2 - Cinética de primeira ordem

Este modelo de cinética foi aplicado aos estudos de dissolução pela primeira vez por Gibaldi e Feldman (1967) e mais tarde por Wagner (1969) (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Hixson e Crowell adaptaram a equação de Noyes-Whitney e obtiveram a seguinte equação (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002) (**Equação 6**):

(6) $$\frac{dW}{dt} = KS(C_s - C)$$

Onde: W = quantidade de soluto na solução ao tempo t, dW/dt = taxa de passagem do soluto para a solução ao tempo t e K = constante.

A partir da equação anterior, integrando-a e aplicando logaritmos decimais (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002), obtém-se a **Equação 7**:

(7) $$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2{,}303}$$

Onde: Q_t = quantidade de fármaco liberado no tempo *t*, Q_0 = quantidade inicial de fármaco na solução e K_1 = constante de liberação de primeira ordem.

Sistemas de liberação que seguem cinética de primeira ordem liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior, onde a velocidade de liberação diminui exponencialmente com o tempo. Assim, a liberação vai ser dependente da concentração de fármaco e o gráfico do logaritmo decimal da quantidade liberada do fármaco *versus* tempo será linear (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

1.2- Leucemia mielóide crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma das leucemias mais extensivamente estudadas, sendo a neoplasia mais compreendida (BRECCIA; ALIMENA, 2010). É uma doença cujo marcador molecular é o rearranjo gênico BCR/ABL, original da translocação t(9;22), conhecida como cromossomo Philadelphia. Essa translocação leva à justaposição do gene ABL (Abelson Tirosina Kinase) do cromossomo 9 e do gene BCR (Breakpoint Cluster Region) do cromossomo 22, produzindo um oncogene que codifica a proteína BCR/ABL com atividade tirosina-quinase (TK) anormal. Em condições normais, a tirosina-quinase participa da transdução do sinal regulatório de diversos processos celulares, como crescimento, metabolismo, diferenciação, adesão e apoptose (ROBINSON; WU; LIN, 2000; SAVAGE; ANTMAN, 2002). A atividade da fusão protéica sobre os mecanismos de controle regulatório da BCR/ABL induz a doença maligna pela ativação citoplasmática múltipla e pela transdução do sinal nuclear, influenciando o crescimento e mecanismos apoptóticos das células hematopoiéticas, resultando em uma proliferação excessiva e sobrevivência reforçada das células leucêmicas (ROWLEY, 1973; DALEY; VAN ETTEN; BALTIMORE, 1990; HEISTERKAMP *et al.*,

1990; LUGO *et al.*, 1990; FADERL *et al.*, 1999; O'DWYER, 2002; GOLDMAN; MELO, 2003; REN, 2005; KRAUSE; VAN ETTEN, 2005). O mecanismo que leva à translocação gênica ainda não foi esclarecido, mas o principal fator sugerido é a radiação, devido à alta incidência de LMC no Japão após a explosão da bomba atômica, em Hiroshima (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007). A incidência da LMC é de um a dois casos por 100 mil habitantes, representando 15% a 20% dos casos de leucemias dos adultos. É mais frequente em adultos entre 40 e 60 anos de idade e afeta ambos os sexos, mas com predominância no sexo masculino (KANTARJIAN *et al.*, 1999; CHOPRA; PU; ELEFANTY, 1999).

A progressão clínica da LMC pode ser dividida em três fases: crônica, acelerada e blástica. No início da fase crônica, que pode durar vários anos, a doença aparentemente é "benigna". Alguns pacientes são assintomáticos, mas outros podem apresentar fadiga, fraqueza, dores de cabeça, irritabilidade, febre, suor noturno e perda de peso. O diagnóstico é realizado pelos achados clínicos, citogenéticos e hematológicos do sangue periférico e medula óssea (FADERL *et al.*, 1999; SAWYERS, 1999).

A fase acelerada surge após um período variável do diagnóstico, de poucos meses a vários anos, e caracteriza-se pelo aumento de blastos na medula óssea e no sangue periférico, leucocitose e basofilia no sangue periférico, anemia e trombocitopenia. Clinicamente, o paciente se torna refratário ao tratamento empregado na fase crônica e pode apresentar hepato-esplenomegalia (BERGANTINI *et al.*, 2005).

Posteriormente a doença evolui para a fase blástica, definida hematologicamente pelo aumento de blastos leucêmicos (linfóides ou mielóides) no sangue periférico e/ou medula óssea (mais de 20%). Nesse estágio da doença,

muitos pacientes evoluem para óbito entre três e seis meses. A progressão para a fase acelerada e blástica parece estar associada, principalmente, à instabilidade genômica, o que predispõe ao aparecimento de outras anormalidades moleculares (FADERL *et al.*, 1999; SAWYERS, 1999).

O principal agente terapêutico empregado na terapia contra a LMC é o Interferon-α (IFN-α), que provoca uma resposta citogenética em 10-25% dos pacientes, com prolongamento significante da sobrevivência, principalmente nos pacientes de baixo risco, obtendo um alto índice de resposta (THE ITALIAN COOPERATIVE STUDY GROUP, 1994; HEHLMANN *et al.,* 2003). É administrado na forma de injeções subcutâneas ou intra-musculares a cada dois dias ou três vezes por semana, por um período de 6 a 24 meses. Apresenta vários efeitos colaterais, como dores de cabeça, artralgias, mialgias, febre, calafrios, falta de apetite, cansaço, irritabilidade, depressão, irritação da pele no local da aplicação e tontura. Por possuir propriedades imunomoduladoras, pode induzir hipotireoidismo ou hipertireoidismo, ou agravar processos auto-imunes já existentes (DUSHEIKO, 1997).

Atualmente, o transplante de medula óssea é o único tratamento possivelmente curativo para a LMC por induzir remissão molecular e eliminação das transcrições BCR-ABL, mas está disponível apenas para um pequeno número de pacientes (relativamente jovens), pela dificuldade de se encontrar um doador antígeno leucocitário humano (HLA) idêntico e implicando em risco de graves complicações, como doença enxerto contra hospedeiro (INCA, 2003; TABAK, 2000).

Recentemente, uma nova classe de fármacos vem sendo utilizada para o tratamento da LMC, os inibidores da enzima tirosina-quinase: mesilato de imatinibe, dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe. Estes fármacos foram projetados racionalmente

delineando uma terapia com alvo molecular após um melhor entendimento das bases moleculares da doença. O alvo na terapia é a enzima tirosina-quinase, BCR-ABL, que é a responsável por grande parte dos eventos leucemogênicos na LMC (MELO; BARNES, 2007)

1.3 – Mesilato de Imatinibe

O mesilato de imatinibe, quimicamente designado como 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil] benzamido metasulfonato (PENG; LLOYD; SCHRAM, 2005), (**Figura 1**) é uma pequena molécula que inibe competitivamente a BCR/ABL TK por ligação ao sítio do ATP, impedindo a fosforilação da tirosina (DRUKER *et al.,* 2001), o que mantém a proteína em sua conformação inativa, impedindo a atividade TK (SCHINDLER *et al*., 2000). Possui fórmula molecular $C_{29}H_{31}N_7O{\bullet}CH_3SO_3H$ e peso molecular de 589,72. Apresenta valores de pKa na faixa de 1,52-8,07. É altamente solúvel em água (>100g/L) em pH 4,2, moderadamente solúvel em pH 7,4 (≈49mg/L) e quase insolúvel em pH 8,0. Dissolve-se rapidamente em solventes polares orgânicos, como metanol e etanol; é fracamente solúvel ou insolúvel em solventes de baixa polaridade (THE MERCK INDEX THIRTEEN EDITION, 2001). É estável a condições de stress ácido (HCl 0,1 M por 6 horas em refluxo) (SZCZEPEK *et al*., 2007), fluido gástrico artificial (1 hora a pH 1,2 e 37ºC), não mostrando hidrólise das ligações amida sob essas condições (PENG; LLOYD; SCHRAM, 2005).

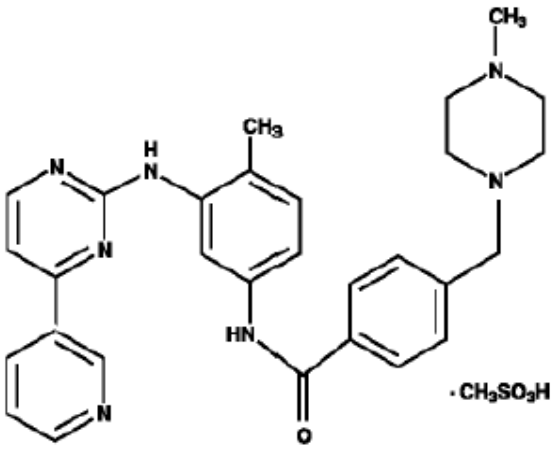

Figura 1 – Estrutura química do mesilato de imatinibe

O fármaco promove a inibição da proliferação e indução de apoptose nas células BCR-ABL-positivas, sem causar nenhum efeito nas células normais (DRUKER *et al.,* 1996; DRUKER *et al.,* 2001; GAMBACORTI-PASSERINI *et al.*, 1997). Os pacientes tratados com mesilato de imatinibe apresentaram um alto índice de remissão na fase crônica. Os efeitos adversos são geralmente leves ou raros. Induz uma resposta citogenética em 50-90% dos pacientes, incluindo em resistentes ao IFN-α (DRUKER *et al.,* 2001; KANTARJIAN *et al.,* 2004).

Alguns pacientes tratados com o mesilato de imatinibe podem desenvolver resistência em função do aumento da expressão de BCR/ABL por amplificação do gene, diminuição da concentração intracelular do fármaco por alterações em proteínas carreadoras, evolução clonal e superexpressão de quinases envolvidas em caminhos diferentes de ativação. Na fase crônica, mais de 40% da resistência é atribuída ao surgimento de clones expressando formas mutadas da BCR/ABL, com substituição dos aminoácidos do domínio ABL quinase, impossibilitando a ligação do mesilato de imatinibe e, consequentemente, a inibição da proteína (BRECCIA; ALIMENA, 2010).

Existem vários métodos descritos para quantificação do mesilato de imatinibe em amostras biológicas, como plasma, cultura de células e urina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detectores de UV e espectrômetro de massas (BAKHTIAR *et al.*, 2002a; BAKHTIAR *et al.*, 2002b; PARISE *et al.*, 2003; WIDMER *et al.*, 2004; GUETENS *et al.*, 2007; PURSCHE *et al.*, 2007; HAOUALA *et al.*, 2008; DE FRANCIA *et al.*, 2009).

Também são encontrados alguns métodos descritos para a análise do mesilato de imatinibe utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detector UV (CLAE-UV) aplicados ao controle de qualidade (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Métodos para quantificação do mesilato de imatinibe encontrados na literatura

Ano	Referência	Análise	Coluna	Fase móvel	Técnica/Detecção
2003	Vivekanand *et al.*	Pureza do mesilato de imatinibe em soluções	Simmetry Shield RP18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	Ácido sulfônico octano sódico 30 mmol em KH_2PO_4 10 mmol:metanol (42:58 v/v)	CLAE/UV
2004	Ivanovic *et al.*	Impurezas na forma farmacêutica de cápsulas de Glivec®	X Terra™ (150 x 4,6 mm x 5 µm)	água:trietilamina:metanol (74:1:25 v/v/v)	CLAE/UV
2004	Medenica *et al.*	Mesilato de imatinibe e sua principal impureza em solução	X Terra™ (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	metanol:água:trietilamina (25:74:1 v/v/v)	HPLC/UV
2005	Rosasco *et al.*	Mesilato de imatinibe em cápsulas comerciais de Glivec®	C18 µBondapak® (150 mm x 3,9 mm x 5 µm)	ácido sulfônico heptano sódico 30 mmol em KH_2PO_4 0,01 M (pH 2,5):Metanol (42:58 v/v),	CLAE/UV
2007	Szczepek *et al.*	Produtos de degradação do mesilato de imatinibe obtidos sob condições de hidrólise e decomposição oxidativa e fotolítica	Waters Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	eluição por gradiente ácido sulfônico octano sódico: metanol	HPLC/MS[1]

[1]MS: Espectrômetro de massa

Por se tratar de um medicamento relativamente novo e sua monografia não ser encontrada em compêndios oficiais, foi proposto desenvolver um método para

análise do mesilato de imatinibe por CLAE-RP e avaliar seu perfil *in vitro* de dissolução.

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe. Para este estudo foram realizadas as seguintes etapas:

- Otimizar as condições para análise do mesilato de imatinibe empregando a cromatografia líquida de alta eficiência;

- Desenvolver e validar um método para análise do mesilato de imatinibe em formas farmacêuticas sólidas (comprimidos);

- Avaliar o perfil *in vitro* de dissolução dos comprimidos em diferentes condições experimentais (pH do meio de dissolução, tipo de aparato e velocidade de agitação);

- Determinar a eficiência de dissolução

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido Shimadzu, modelo LC-10ADvp (Kyoto, Japan).
    - Detector UV-Vis, modelo SPD-10Avp (Kyoto, Japan).
    - Integrador, modelo C-R6A Chromatopac (Kyoto, Japan).
    - Injetor Rheodyne, modelo 7125 (California, USA) com loop de 20 µL.
- Coluna Gemini Phenomenex® C18 (250mm x4,6 mm, partículas de 5 µm) (Torrance, USA).
- Coluna de guarda Gemini-NX Phenomenex® C18 (4,0 x 3,0 mm) (Torrance, USA).
- Espetrofotômetro FEMTO – 800XI (São Paulo, Brasil) com detector composto por dois fotodiodos de silício, acoplado a um microcomputador com software FemtoScan®.
- Peagômetro, modelo PHTEC – PHS-3B (São Paulo, Brasil).
- Banho de ultra-som Quimis, modelo Q3350 (Diadema, Brasil).
- Agitador de tubos Phoenix, modelo AP56 (São Paulo, Brasil).
- Dissolutor Hanson Research, modelo SR8 PLUS – Dissolution Test Station (Chatsworth, USA).
- Dissolutor Nova Ética, modelo 299/8 (Vargem Grande Paulista, Brasil).
- Balança analítica Ohaus, modelo Adventurer (Lindavista, Mexico).
- Balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D (Kyoto, Japan).

3.2 - Reagentes e solventes

- Acetato de amônio (Merck, Darmstadt, Germany).
- Acetato de sódio (NaAc) (Merck, Darmstadt, Germany).
- Ácido acético glacial (Synth, Diadema, Brasil).
- Ácido bórico (Merck, Darmstadt, Germany).
- Ácido clorídrico (HCl) (Synth, Diadema, Brasil).
- Ácido ortofosfórico (Merck, Darmstadt, Germany).
- Fosfato de potássio monobásico (Merck, Darmstadt, Germany).
- Tetraborato de sódio decahidratado (J.T. Baker, Philipsburg, USA).
- Trietilamina (Acros Organics, New Jersey, USA).
- Acetonitrila (Fischer Scientific, Fair Lawn, USA).
- Metanol (J.T.Baker, Philipsburg, USA).
- Água ultrapura, obtida pelo Sistema Milli-Q PLUS (Millipore/Millipore Corporation, Bedford, USA).

3.3 - Solução-padrão

O padrão de mesilato de imatinibe foi gentilmente cedido pela Novartis Pharma AG – Basel – Switzerland. A solução estoque foi preparada em metanol, grau cromatográfico, na concentração de 1,0 mg/mL (base livre), estocada a -20°C. A partir desta solução estoque foram obtidas as soluções de trabalho, também diluídas em metanol, nas concentrações de 200,0; 150,0; 100,0; 75,0; 50,0; 25,0; 10,0 e 5,0 µg/mL, estocadas a 4°C.

3.4 – Comprimidos de Glivec® (mesilato de imatinibe)

Os comprimidos de mesilato de imatinbe foram adquiridos comercialmente, na dose de 100 mg. De acordo com a bula do medicamento, o comprimido possui como excipientes: celulose microcristalina, crospovidona, hipromelose, estearato de magnésio e sílica coloidal anidra; e revestimento: óxido de ferro vermelho, óxido de ferro amarelo, polietilenoglicol, talco e hipromelose.

3.5 – Determinação do espectro de absorção do mesilato de imatinibe

A varredura espectrofotométrica foi realizada para seleção do melhor comprimento de onda para detecção do fármaco. Além disso, também foi avaliada a influência do solvente utilizado para dissolução do fármaco.

As amostras para obtenção dos espectros de absorção do mesilato de imatinibe foram preparadas em três solventes diferentes: metanol, tampão fosfato de potássio (pH 9,1) e tampão borato de sódio (pH 3,0), na concentração de 100 µg/mL.

O espectrofotômetro foi designado para operar no modo de varredura. Previamente à varredura espectral, foi efetuada a correção da linha de base através do preenchimento de uma cubeta de cristal de quartzo com o respectivo solvente sem o fármaco, ou seja, o branco da análise. Após lavagem da cubeta, cada amostra em seu respectivo solvente foi submetida à varredura no intervalo de comprimento de onda correspondente a região do ultra-violeta.

3.6 – Análise cromatográfica

Foram transferidos 25 µL da solução-padrão de mesilato de imatinibe (100 mg/mL) para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi ressuspenso em 50 µL de fase móvel. Os tubos foram agitados em *mixer* por 1 min e realizada a análise cromatográfica.

Na otimização da análise cromatográfica, diversas composições de fases móveis foram testadas (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Composição das fases móveis testadas para análise do mesilato de imatinibe

Composição da fase móvel	Proporção % (v/v ou v/v/v)
água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico): metanol	74:1:25
	64:1:35
	45:1:54
tampão acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:acetonitrila	35:65
tampão acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:metanol	30:70
	35:65
tampão acetato de amônio 20 mmol/L pH 7,5 (ajustado com ácido acético):metanol	35:65
tampão acetato de amônio 20 mmol/L pH 5,5 (ajustado com ácido acético):metanol	35:65
tampão acetato de amônio 20 mmol/L pH 3,0 (ajustado com ácido acético):metanol	35:65
tampão acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 4,5 (ajustado com ácido acético):metanol	35:65
	40:60
tampão acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 3,0 (ajustado com ácido acético):metanol	35:65
	40:60

As soluções aquosas utilizadas na preparação das fases móveis foram filtradas em membranas Millipore, poros de 0,22 µm e, após adição do modificador orgânico, as fases móveis foram desgaseificadas no ultrassom e no vácuo, concomitantemente, durante 5 min. O objetivo desta desgaseificação é eliminar gases dissolvidos que possam interferir na análise. Foram calculados os parâmetros cromatográficos, fator de retenção (k) e número de pratos (N).

O fator de retenção (k) foi calculado pela **Equação 8:**

(8)

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

onde: t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e t_M ao tempo de retenção de um composto não retido na coluna.

O número de pratos (N) foi calculado pela **Equação 9:**

(9)

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

onde: t_R corresponde ao tempo de retenção do composto de interesse e w_b a largura da base do pico do composto de interesse.

3.7 – Validação

A validação da metodologia analítica foi realizada com base na Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003b).

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido estão sendo atendidos (NBR ISSO/IEC 17025, 2001).

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP, 1999; RIBANI *et al.*, 2004).

Para a validação do método desenvolvido foram avaliados os parâmetros: linearidade; precisão e exatidão intra-ensaio; precisão e exatidão inter-ensaio; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

3.7.1 - System Suitability

O system suitability foi realizado para verificar o desempenho do sistema, isto é, garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados com precisão e exatidão aceitáveis. Para avaliar o desempenho do equipamento foram injetadas, três vezes, a mesma solução-padrão contendo 25 µg/mL de mesilato de imatinibe.

3.7.2 - Calibração e linearidade

Foi preparada uma solução estoque contendo exatamente 1,0 mg/mL (base livre) de Mesilato de Imatinibe em metanol, a partir da qual foram preparadas soluções nas concentrações de 150,0; 100,0; 75,0; 50,0; 25,0 e 10,0 µg/mL, analisadas em triplicata para a obtenção da linearidade. As concentrações de cada uma das soluções foram plotadas no eixo das abscissas e no eixo das ordenadas os valores de área de seus respectivos picos, verificando-se a proporcionalidade da resposta em relação à concentração, através do cálculo de coeficiente de correlação linear (r).

A curva de calibração foi obtida de forma semelhante à descrita acima, utilizando as concentrações 150,0; 75,0; 25,0 e 10,0 µg/mL.

3.7.3 - Precisão e exatidão

Para a determinação da precisão, foram utilizadas três níveis de concentrações diferentes do fármaco em solução padrão (150 µg/mL, 75 µg/mL e 25 µg/mL), analisadas em triplicata no mesmo dia (precisão intra-ensaio) e em três dias consecutivos (precisão inter-ensaio).

A avaliação da precisão do método foi realizada através da determinação do CV (%), utilizando os gráficos da calibração e as dispersões em relação aos valores médios de acordo com a **Equação 10**:

$$CV = \frac{S}{\overline{X}} x100 \quad (10)$$

Onde: S = estimativa do desvio padrão; $\overline{X}$ = média dos valores obtidos

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação. O teste consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo (AOAC, 1995).

Uma solução padrão de mesilato de imatinibe foi preparada na concentração de 200 µg/mL.

Para o preparo da amostra, foram pesados 3 comprimidos de Glivec® e triturados em gral de porcelana. Após isto, foi pesada a massa equivalente a 10 mg de princípio ativo e transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, foram adicionados, aproximadamente, 5 mL de metanol e o balão volumétrico foi submetido ao banho de ultrassom por 5 minutos. Posteriormente, o volume do balão foi completado com metanol e a solução foi centrifugada a 2190 *g* por 5 minutos e filtrada em membrana de 0,45 µm. Foi retirada uma alíquota de 2 mL do sobrenadante e diluída, em metanol, para obter uma concentração final de 200 µg/mL.

Após o preparo da solução padrão e da amostra, alíquotas de ambas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, conforme descrito na **Tabela 4** e o volume foi completado com metanol.

Para a exatidão intra-ensaio foram analisadas as três concentrações em triplicata, no mesmo dia, e para a exatidão inter-ensaio foram analisadas as mesmas concentrações, em triplicata, em três dias consecutivos.

Tabela 4 - Preparo das soluções para a exatidão

Balão volumétrico (10 mL)	Volume solução amostra de comprimido (200 µg/mL)	Volume adicionado de solução-padrão (200 µg/mL)	Concentração final (µg/mL)
1	0,5 mL	-	10
2	0,5 mL	5 mL	110
3	0,5 mL	3 mL	70
4	0,5 mL	0,5 mL	20

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada, de acordo com a **Equação 11**:

(11) $$E(\%) = \frac{(A+P) - A}{P}$$

Onde: (A+P) = amostra + padrão; A = amostra; P = concentração teórica do padrão usado para fortificar a amostra

3.7.4 - Limite de quantificação

A sensibilidade da técnica foi estabelecida utilizando o limite de quantificação como parâmetro, ou seja, a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada (RIBANI *et al.,*2004). Para isto, a menor concentração utilizada na obtenção da curva analítica, 10 µg/mL, foi analisada em sextuplicata.

3.7.5 – Robustez

Para a determinação da robustez, foi utilizado o teste de Youden, que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações (INMETRO, 2003).

Foram realizados catorze ensaios separados em três níveis de concentrações (25,0; 75,0 e 150,0 µg/mL) para determinar os efeitos da variação de nove diferentes fatores no procedimento analítico. Foi realizada uma curva de calibração para cada condição, utilizando as concentrações de 10,0; 25,0; 75,0 e 150,0 µg/mL, analisadas em duplicata.

Os fatores utilizados na avaliação da robustez estão descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Fatores avaliados na determinação da robustez

Fator	Variação
pH (fase aquosa)	2,5
	3,0
	3,5
Vazão de fase móvel	0,8 mL/min
	1,0 mL/min
	1,2 mL/min
Proporção entre fase aquosa e modificador orgânico (%)	45:55 (v/v)
	40:60 (v/v)
	35:65 (v/v)

Foi feita a distribuição dos fatores e enumeração dos experimentos conforme o **Quadro 1**.

Quadro 1 – Distribuição dos fatores seguindo o teste de Youden

Experimento	Variação	Experimento	Variação
1	pH[1] = 3,0 Vazão = 1,0 mL/min Proporção[2] = 60:40	**8**	pH[1] = 3,5 Vazão = 1,2 mL/min Proporção[2] = 65:35
2	pH[1] = 3,0 Vazão = 1,0 mL/min Proporção[2] = 65:35	**9**	pH[1] = 3,0 Vazão = 0,8 mL/min Proporção[2] = 55:45
3	pH[1] = 3,0 Vazão = 1,2 mL/min Proporção[2] = 60:40	**10**	pH[1] = 2,5 Vazão = 1,0 mL/min Proporção[2] = 55:45
4	pH[1] = 3,0 Vazão = 1,2 mL/min Proporção[2] = 65:35	**11**	pH[1] = 2,5 Vazão = 0,8 mL/min Proporção[2] =60:40
5	pH[1] =3,5 Vazão =1,0 mL/min Proporção[2] =60:40	**12**	pH[1] = 2,5 Vazão = 0,8 mL/min Proporção[2] = 55:45
6	pH[1] = 3,5 Vazão = 1,0 mL/min Proporção[2] = 65:35	**13**	pH[1] = 2,5 Vazão = 1,0 mL/min Proporção[2] = 60:40
7	pH[1] = 3,5 Vazão = 1,2 mL/min Proporção[2] = 60:40	**14**	pH[1] = 3,0 Vazão = 1,0 mL/min Proporção[2] = 55:45

[1]Valor de pH da fase aquosa; [2]Proporção (%) de metanol:tampão acetato de sódio.

Para a determinação da influência de cada fator, foram calculados os erros médios e utilizada a **Equação 12**:

(12)

$$Influência = \frac{x\beta - x\gamma}{x\alpha}$$

Onde: xβ = média das variações para mais; xγ = média das variações para menos; xα = média da variação da condição nominal.

3.7.6 - Seletividade

Para avaliar a presença de possíveis interferentes presentes que poderiam interferir na quantificação do mesilato de imatinibe foi feita a análise do branco, ou seja, fase móvel e meio de dissolução (HCl 0,1 N pH 1,2) e comparada à análise de uma amostra contendo o fármaco neste mesmo meio de dissolução.

3.7.7 - Estabilidade

A estabilidade foi avaliada através de um teste de curta duração (suficiente para a realização do ensaio de dissolução e análise das amostras) em triplicata, utilizando duas soluções: meio HCl 0,1 N pH 1,2 e tampão NaAc pH 4,5. As amostras foram preparadas da seguinte maneira: a 1 mL de solução-padrão, preparada em metanol, na concentração de 50 µg/mL foi adicionado 1 mL da solução (HCl ou NaAc). Os tubos contendo as amostras foram mantidos à temperatura ambiente e as amostras foram coletadas nos intervalos de 0 h, 6 h e 12 h. Os cálculos foram feitos baseados em uma curva de calibração e comparados com amostras recém-preparadas.

3.8 – Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução dos comprimidos

Os ensaios de dissolução *in vitro* foram realizados utilizando comprimidos de 100 mg de Glivec® (Mesilato de Imatinibe) em cubas com capacidade de 900 mL de meio, à temperatura de 37±0,5°C, alternando algumas condições, conforme a **Tabela 6**.

Tabela 6 – Condições utilizadas para o teste de dissolução *in vitro* de comprimidos de mesilato de imatinibe

Condições Avaliadas	Variação
Tipo de aparato	Aparato 1 (Cesta)[1]
	Aparato 2 (Pá)[1]
Velocidade de agitação (rotação)	50 rpm
	75 rpm
	100 rpm
Meio de dissolução	HCl 0,1 N
	Tampão acetato de sódio pH 4,5[2]
	Tampão fosfato de potássio monobásico pH 6,8[2]

[1] denominação conforme USP 30; [2] preparado conforme USP 30

Foram coletadas alíquotas de 2,0 mL nos tempos: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos; e reposto o volume com o meio de dissolução empregado no ensaio, para que o volume permanecesse constante. As alíquotas coletadas foram filtradas em membranas de 0,45 µm. As condições *sink* foram mantidas a partir do conhecimento da solubilidade do fármaco descrita na literatura (altamente solúvel em água (>100 g/L) em pH 4,2, moderadamente solúvel em pH 7,4 (≈49mg/L) e quase insolúvel em pH 8,0 (THE MERCK INDEX THIRTEEN EDITION, 2001).

Para a análise cromatográfica, foram transferidos 25 µL do filtrado do meio de dissolução para um tubo cônico e adicionados 25 µL de fase móvel, homogeneizados com o auxílio de um *mixer* por 1 minuto e realizada a análise cromatográfica.

O cálculo da quantidade de fármaco dissolvido foi realizado baseado em uma curva analítica preparada nas concentrações de 10 µg/mL, 25 µg/mL, 75 µg/mL e 150 µg/mL e o cálculo da porcentagem de fármaco dissolvido foi realizada de acordo com a **Equação 13**:

$$\%Dissolvida = Cb + \left(\frac{Ca \times Vc}{Vd}\right) \quad \textbf{(13)}$$

Onde: Cb = Concentração da amostra a ser corrigida; Ca = Concentração da amostra coletada anteriormente; Vc = Volume coletado; Vd = Volume do meio de dissolução (SOUZA, 2009).

3.9 – Determinação da eficiência de dissolução

A eficiência de dissolução foi determinada através da razão entre a área sob a curva (ASC) de dissolução no intervalo de tempo entre 0 e 60 minutos (ASC 0-60) e

a área total do retângulo (ATR) definido pela ordenada (100% de dissolução) e pela abscissa (tempo = 60 minutos). A eficiência de dissolução, expressa em porcentagem, foi calculada pela **Equação 14** (MARTINELLO; SERRA, 2008):

(14) $$ED\% = \frac{ASC\ (0-60)}{ATR}\ x100$$

3.10 – Análise estatística

A análise dos dados obtidos foi feita utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey, e nível de significância (α) 5%.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Determinação do espectro de absorção do mesilato de imatinibe

Com o objetivo de definir o comprimento de onda de absorção máximo do mesilato de imatinibe e avaliar uma possível influência do pH do solvente sobre esta absorção, foi preparada uma solução do padrão de mesilato de imatinibe na concentração de 100 µg/mL em três solventes diferentes: metanol, tampão borato de sódio 0,1 mol/L (pH 9,12) e tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L (pH 3,0) . A **Figura 2** apresenta os resultados obtidos após a realização da varredura nos três solventes, respectivamente.

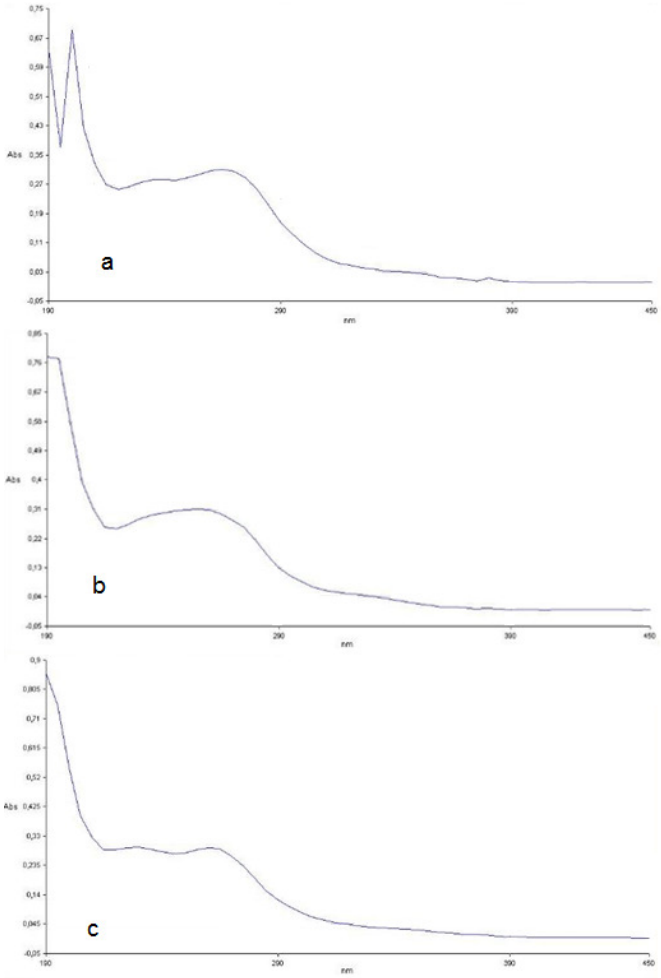

Figura 2 – Espectro de absorção do mesilato de imatinibe na concentração de 100 µg/mL em a - metanol; b – tampão borato de sódio 0,1 mol/L pH 9,1; c – tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L pH 3,0.

Todos os compostos orgânicos são capazes de absorver radiação eletromagnética por conter elétrons de valência que podem ser excitados a níveis de energia mais altos. As energias de excitação associadas a elétrons formando a maior parte das ligações simples são altas, de modo que a absorção por elas está restrita à chamada região ultravioleta de vácuo ($\lambda < 185$ nm), onde componentes da atmosfera também absorvem energia. As dificuldades experimentais associadas com o ultravioleta de vácuo são significativas; como conseqüência, a maioria das investigações espectrofotométricas de compostos orgânicos ocorre na região de comprimento de onda maior do que 185 nm. A absorção de radiação visível e de ultravioleta de maior comprimento de onda está restrita a um número limitado de grupos funcionais (*cromóforos)* que contem elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas. Os espectros eletrônicos de moléculas orgânicas contendo cromóforos são normalmente complexos, porque a superposição de transições vibracionais com transições eletrônicas leva a uma combinação intricada de linhas superpostas (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

Em relação ao solvente utilizado para a análise, o melhor é aquele que não apresenta interferências no comprimento de onda de análise do fármaco. Como pode ser observado pela figura apresentada acima, não foram observados deslocamentos significativos nos comprimentos de onda nos diferentes meios testados, portanto, os três solventes avaliados são adequados para análise do analito em questão.

Assim, o melhor intervalo de absorção, nos três solventes avaliados, está situado entre 260-270 nm e o comprimento de onda de 265 nm foi o escolhido para a análise do mesilato de imatinibe.

4.2 - Análise cromatográfica

Várias composições de fases móveis foram avaliadas para análise do mesilato de imatinibe. Baseando-se em análises anteriores (IVANOVIC *et al.*, 2004) foi testada inicialmente a fase móvel composta por água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (74:1:25 v/v/v) e vazão de 1,0 mL/min. Nesta condição foi possível obter a eluição do mesilato de imatinibe, entretanto, sem eficiência, apresentando cauda e tempo de análise longo, devido a uma maior retenção do fármaco pela coluna (**Figura 3**).

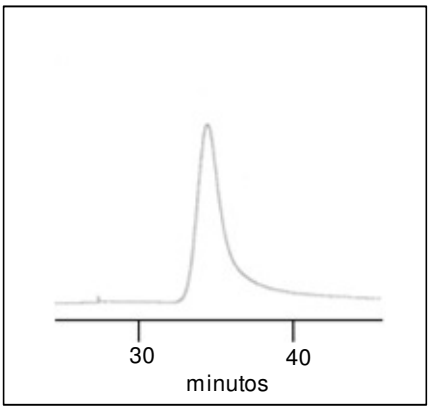

Figura 3 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (74:1:25, v/v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

Na tentativa de obter um menor tempo de análise e uma melhor eficiência, foi aumentada a proporção do solvente orgânico (metanol) na fase móvel. Foram utilizadas fases móveis compostas por água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (64:1:35 v/v/v) e água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (45:1:54 v/v/v). Como pode ser observado, pelas **Figuras 4 e 5**, respectivamente, à medida que foi aumentada a proporção do solvente orgânico

na fase móvel houve uma diminuição na retenção do analito, resultado esperado e compatível com o mecanismo de fase reversa (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

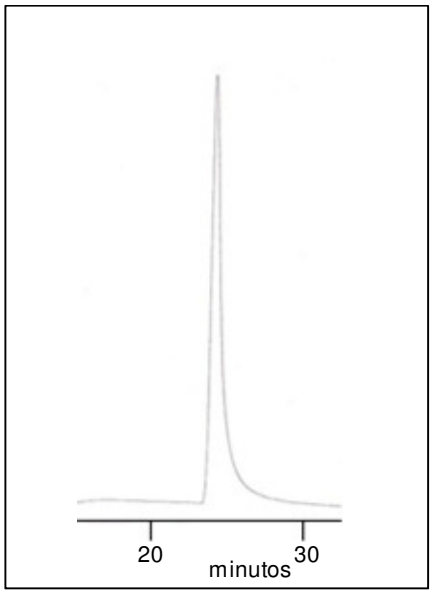

Figura 4 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: água:trietilamina pH 2,4 (ajustado com ácido ortofosfórico):metanol (64:1:35, v/v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

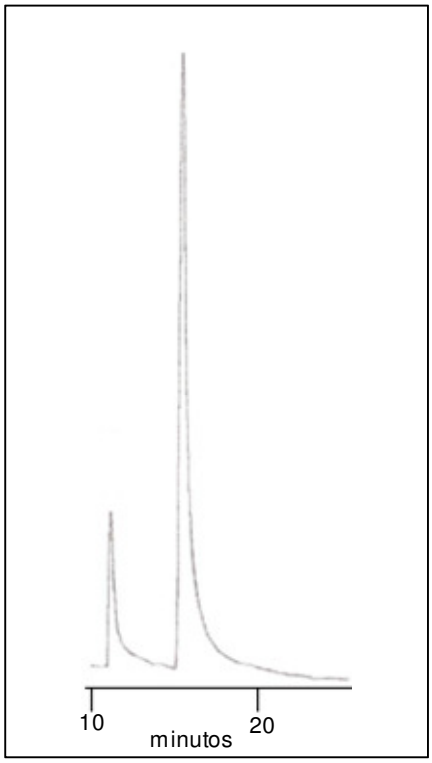

Figura 5 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: água:trietilamina pH 2,4 (acertado com ácido ortofosfórico):metanol 45:1:54 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

Apesar de obter redução do tempo de retenção, o pico ainda apresentava cauda. Com o intuito de reduzir a cauda e melhorar a simetria do pico, foi avaliada uma nova fase móvel composta por acetato de amônio 20 mmol/L, pH 10,6:acetonitrila (35:65 v/v) e vazão de 1,0 mL/min (**Figura 6**).

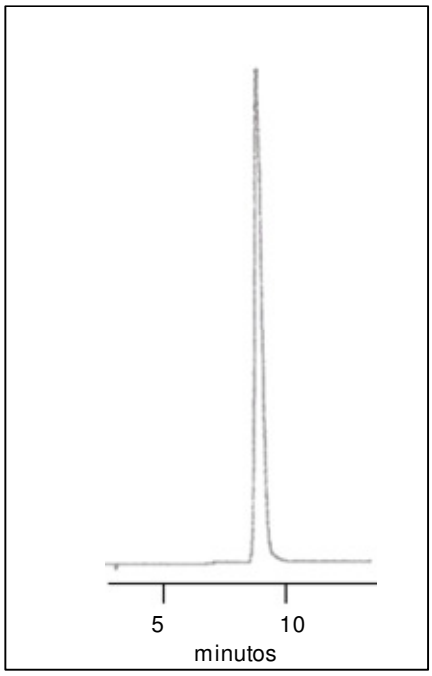

Figura 6 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:acetonitrila (35:65 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

Entretanto, apesar de ter sido obtido um pico simétrico e um tempo de retenção relativamente adequado, a utilização de acetonitrila como componente da fase móvel tornou-se inviável por problemas de importação, acarretando em um custo muito elevado deste solvente. Assim, a acetonotrila foi substituída pelo metanol e foram avaliadas novas composições de fases móveis compostas por tampão acetato de amônio 20 mmol/L, pH 10,6 e metanol, em diferentes proporções. As **Figuras 7 e 8** mostram os cromatogramas obtidos utilizando 65 e 70 % de metanol na fase móvel, respectivamente.

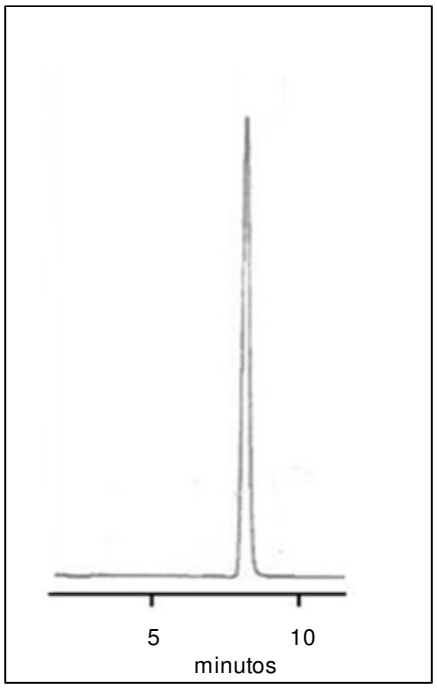

Figura 7 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:metanol (35:65 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

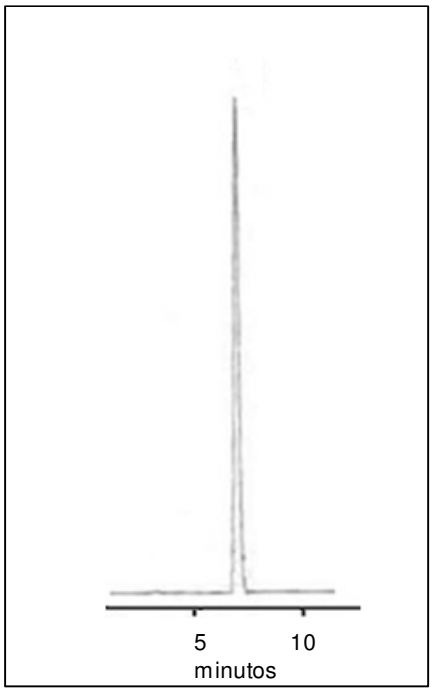

Figura 8 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de amônio 20 mmol/L pH 10,6:metanol (30:70 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

Para a realização dos estudos posteriores de dissolução *in vitro*, foram avaliadas também fases móveis com valores de pH mais baixos, uma vez que os meios de dissolução testados seriam compostos por soluções no intervalo de pH de 1,2 a 6,8. A literatura recomenda que o solvente usado para injeção seja o mesmo ou de composição próxima a da fase móvel para não comprometer a análise (QUATTROCCHI; ANDRIZZI; LABA,, 1992). Assim, foram avaliadas fases móveis compostas por tampão acetato de sódio 10,7 mmol/L, pH 3,00 e metanol nas proporções de 65 e 60 % (**Figuras 9 e 10**). Com estas composições de fases móveis foi possível obter um tempo de análise rápido, com eficiência e simetria do pico.

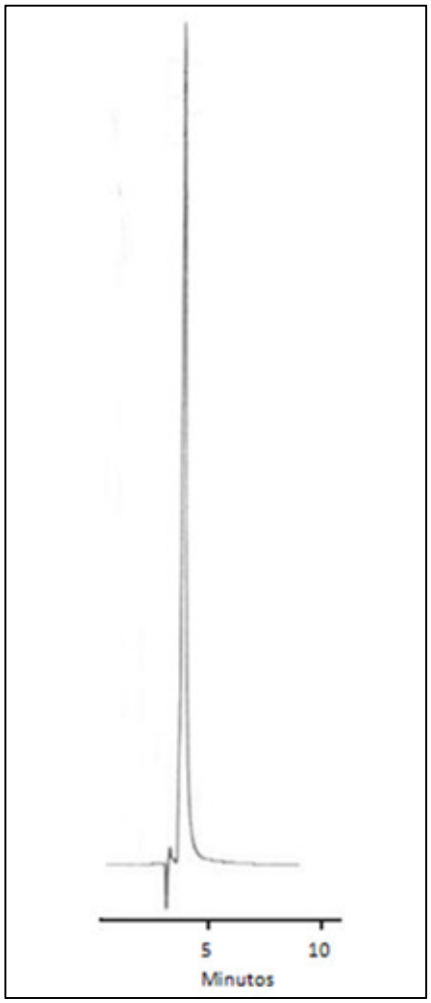

Figura 9 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 3,0: metanol (35:65 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

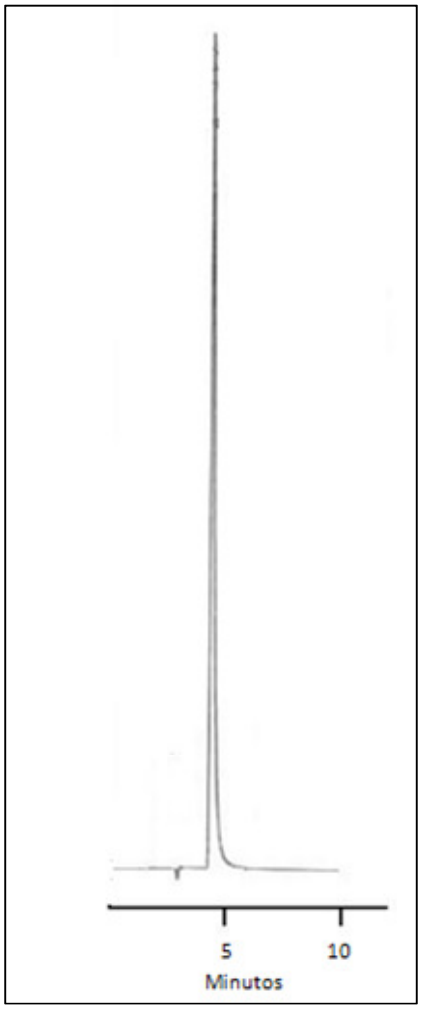

Figura 10 - Análise do mesilato de imatinibe
Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex® (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 10,6:metanol (40:60 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm.

As condições definidas para análise do mesilato de imatinibe estão apresentadas na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Condições cromatográficas para análise do mesilato de imatinibe

Condições	Método Otimizado
Equipamento	CLAE Shimadzu®
Fase móvel	Tampão acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 3,0: metanol (40:60, v/v)
Coluna	Gemini Phenomenex® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Coluna de guarda	Gemini-NX Phenomenex® C18 (4,0 x 3,0 mm)
Comprimento de onda	265 nm
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura	25 °C
Tempo de retenção	4,7 min

A **Tabela 8** mostra alguns parâmetros cromatográficos, como fator de retenção e número de pratos obtidos na análise do mesilato de imatinibe.

Tabela 8 – Parâmetros cromatográficos obtidos para análise do mesilato de imatinibe

Parâmetros	Dia	Mesilato de imatinibe
k	Dia 1	4,39
	Dia 2	4,32
	Dia 3	4,46
N	Dia 1	2518
	Dia 2	2442
	Dia 3	2597

k: fator de retenção; N: número de pratos

4.3- Validação do método analítico

O objetivo da validação é demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida (ANVISA, 2003b). Assim sendo, a etapa de validação do método é extremamente importante, porque ela garante a veracidade dos resultados obtidos.

4.3.1 - *System suitability*

O *system suitability* foi realizado antes de cada dia de validação. Foram feitas três injeções de solução-padrão e os seguintes parâmetros foram avaliados: assimetria, número de pratos e coeficiente de variação (CV %) da área do pico e tempo de retenção. A **Tabela 9** mostra a *performance* do sistema para a validação do mesilato de imatinibe e os valores recomendados para cada parâmetro avaliado segundo a USP 32 (2009) e o fabricante da coluna cromatográfica utilizada.

Para todas as injeções do *system suitability*, a assimetria foi menor do que 2,0, o número de pratos foi maior do que 2000 e os coeficientes de variação da área do pico e tempo de retenção menores do que 2,0 %. Todos estes valores estão em acordo com as recomendações (RIBANI *et al.*,2004).

Tabela 9 - Resultados do *system suitability* para análise do mesilato de imatinibe

Parâmetros	Recomendações	Dia	Minimo	Maximo	CV (%)
Tempo de retenção	CV (%) < 2	Dia 1	4,390	4,393	0,04
		Dia 2	4,290	4,360	0,86
		Dia 3	4,453	4,467	0,16
Área	CV (%)< 2	Dia 1	711996	713485	0,10
		Dia 2	758859	777039	1,19
		Dia 3	739799	757246	1,16
Número de pratos	Valores > 2000	Dia 1	2517	2520	0,07
		Dia 2	2403	2482	1,66
		Dia 3	2589	2606	0,33
Assimetria	Valores < 2	Dia 1	1,79	1,82	1,17
		Dia 2	1,59	1,67	3,47
		Dia 3	1,73	1,75	0,82

CV (%) coeficiente de variação

4.3.2 - Calibração e linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a avaliação da linearidade são utilizadas concentrações superiores àquelas empregadas para a construção do gráfico de calibração. A linearidade do método proposto foi avaliada usando a faixa de concentração de 10 µg/mL a 150 µg/mL. O gráfico de linearidade (**Figura 11**) foi construído colocando-se no eixo das abscissas as concentrações e no eixo das ordenadas área dos picos obtidos.

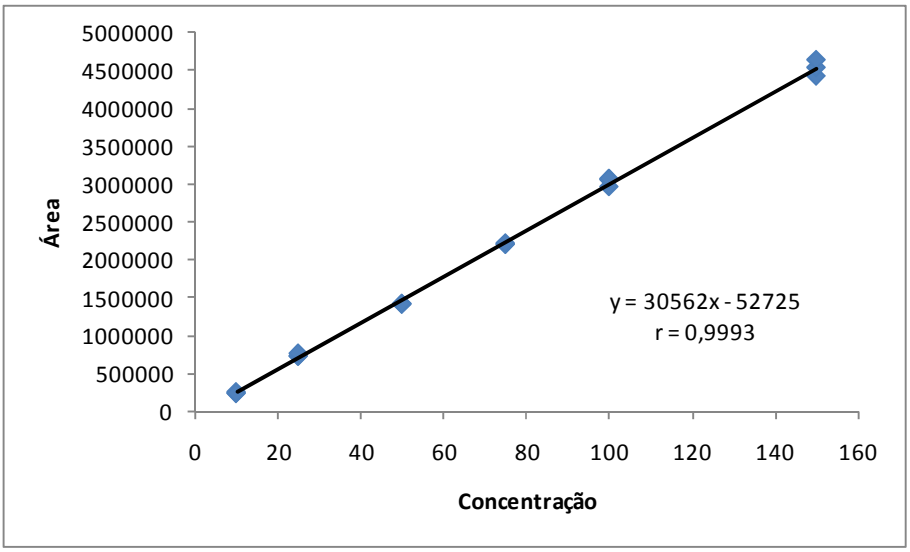

Figura 11 – Gráfico de calibração para análide do mesilato de imatinibe no intervalo de concentração de 10 µg/mL a 150 µg/mL, referente à linearidade

Conforme preconizado pela ANVISA (2003b), para métodos analíticos, são aceitáveis para linearidade, coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,99 e os desvios dos valores nominais não devem ser superiores a 5 %. De acordo com a **Figura 11**, no intervalo de concentração de 10 µg/mL a 150 µg/mL, foi obtido um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9993 e desvios de coeficiente de variação entre 0,32 e 4,23 %.

4.3.3 - Precisão intra e inter-ensaio

A precisão representa a dispersão entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI *et al.*, 2004). A precisão e exatidão podem ser medidas da repetibilidade que se refere ao uso do procedimento analítico no laboratório, por um curto período, usando o mesmo analista e o mesmo equipamento (precisão e exatidão intra-ensaios). Já a precisão e exatidão inter-ensaios referem-se ao uso do procedimento analítico em diferentes condições. A precisão e exatidão são os critérios mais importantes para a avaliação de um método, pois determinam o erro da análise (PENG; CHIOU, 1990).

Para a avaliação da precisão do método analítico, foram empregadas soluções de mesilato de imatinibe em três níveis de concentração (em triplicata): 25, 75 e 150 µg/mL. O calculo dos coeficientes de variação para os três níveis avaliados, apresentaram, tanto na precisão intra-ensaio quanto na precisão inter-ensaio, valores abaixo de 5% (**Tabela 10**), como preconizado pela (ANVISA, 2003b).

Tabela 10 – Precisão do método para análise do mesilato de imatinibe

Concentração nominal (µg/mL)	25	75	150
Intra-ensaio			
Concentração analisada (µg/mL)	25,86	77,23	148,97
N	3	3	3
CV (%)	0,174	0,41	1,83
Inter-ensaio	25	75	150
Concentração analisada (µg/mL)	25,68	75,26	149,82
N	9	9	9
CV (%)	2,16	2,30	1,40

CV: coeficiente de variação; n: número de determinações

4.3.4 - Exatidão intra e inter-ensaio

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). Assim como para a precisão, foram avaliadas exatidão intra e inter-ensaio, em três níveis de concentração (em triplicata) e em três dias consecutivos, respectivamente.

Os resultados obtidos na determinação da robustez estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Exatidão do método para análise do mesilato de imatinibe

Concentração nominal (µg/mL)	10	60	100
Intra-ensaio			
N	3	3	3
Exatidão (% R)	100,85	97,72	100,11
Inter-ensaio			
N	9	9	9
Exatidão (% R)	100,70	100,44	97,10

n: número de determinações

Os valores de porcentagem de recuperação estão situados entre 95 e 105%, atendendo as especificações da ANVISA (2003b).

4.3.5 - Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado com precisão e exatidão (calculada de acordo com ANVISA, 2003b) inferiores a 5% pela análise do padrão do fármaco, em sextuplicata, na concentração de 10 µg/mL. A **Tabela 12** apresenta os valores de precisão e exatidão obtidos para o limite de quantificação. Este limite é adequado para a quantificação do mesilato de imatinibe nos ensaios de dissolução.

Tabela 12 – Limite de quantificação para análise do mesilato de imatinibe

Concentração nominal	Concentração experimental média (µg/mL) n = 6	Exatidão (E%)	Precisão (CV%)
10	9,89	98,93	4,23

n: número de experimentos

4.3.6 - Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2003).

A **Tabela 13** mostra os valores de coeficiente de correlação linear (r) o resultado das médias dos erros, obtidas em cada um dos experimentos:

Tabela 13 – Valores de coeficiente de correlação linear e erro experimental da robustez

Experimento	Erro (E%)	(r)
1	2,71	0,9995
2	2,37	0,9997
3	2,53	0,9996
4	1,94	0,9998
5	2,52	0,9996
6	3,51	0,9991
7	2,36	0,9996
8	2,53	0,9997
9	3,43	0,9994
10	2,42	0,9997
11	3,10	0,9996
12	1,92	0,9998
13	1,91	0,9997
14	3,55	0,9994

(r): coeficiente de correlação linear

Após substituição dos valores relativos a cada fator e aplicados na fórmula descrita no item 3.6.5, foram obtidos os valores de influência para cada parâmetro, apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Valores de influência obtidos para cada parâmetro

Fator	Influência
pH (fase aquosa)	0,04272
Vazão de fase móvel	-0,016485
Proporção entre fase aquosa e modificador orgânico	-0,18025

Os valores de influência não apresentaram diferença estatisticamente significativa (P>0,05) e as variações avaliadas não ocasionaram prejuízos na linearidade, fato confirmado pelos valores de r (coeficiente de correlação linear) obtidos (superiores a 0,99).

4.3.7 - Seletividade

Seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

Para a determinação da seletividade, foi efetuada a análise de uma amostra isenta do fármaco (fase móvel + meio de dissolução) (**Figura 12a**) e uma amostra com o fármaco, no meio de dissolução (**Figura 12b**).

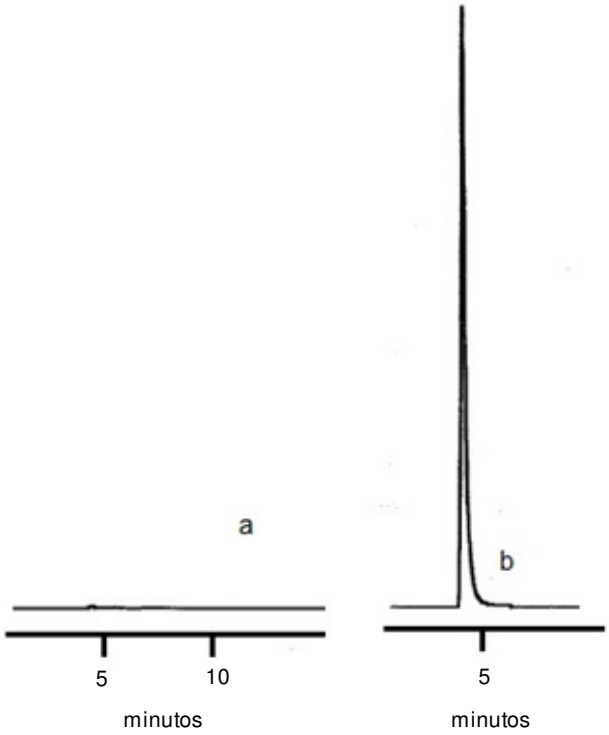

Figura 12 – Seletividade do método para análise do mesilato de imatinibe. a – fase móvel e meio de dissolução (HCl 0,1 N pH 1,2), b – padrão de mesilato de imatinibe em meio de dissolução. Condições cromatográficas: coluna C18 Gemini Phenomenex (250 mm x4,6 mm, partículas de 5 µm), fase móvel: acetato de sódio 10,7 mmol/L pH 10,6:metanol (40:60 v/v), vazão: 1,0 mL/min, detecção em 265 nm

Pela **Figura 12** pode ser observado que não a eluição de interferentes no intervalo correspondente à eluição do mesilato de imatinibe.

4.3.8 - Estabilidade

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes utilizados devem ser estáveis por um período razoável (RIBANI *et al.*,

2004). Com o intuito de avaliar a estabilidade do fármaco, foi efetuado um teste de curta duração em diferentes soluções (HCl 0,1 N pH 1,2 e tampão NaAc pH 4,5). Alíquotas foram analisadas nos intervalos de tempo de 0h, 6h e 12h e comparadas com amostras recém-preparadas (**Tabela 15).**

Tabela 15 – Avaliação da estabilidade do mesilato de imatinibe

Tempo (horas)	HCl 0,1N pH 1,2 % encontrada	Tampão NaAc pH 4,5 % encontrada
0	96,41	98,08
6	98,14	98,51
12	97,96	99,96
CV(%)[b]	1,63	0,99

CV: coeficiente de variação. Número de amostras = 3

A análise estatística dos resultados obtidos não indicou diferenças estatisticamente significativas, indicando que o fármaco é estável nas condições avaliadas.

4.4- Avaliação do perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos

Conhecendo-se a cinética de liberação do fármaco em uma formulação, é possível determinar a quantidade de fármaco dissolvido, a velocidade de liberação e os possíveis problemas que possam ocorrer durante a dissolução (AGUIAR, 2009).

No caso de especificações farmacopéicas não-disponíveis, recomenda-se estabelecer um perfil de dissolução, obtido com, no mínimo cinco pontos de amostragem, realizado sob várias condições, podendo incluir no mínimo três meios de dissolução diferentes (valores de pH entre 1,0 a 6,8), adição de tensoativos e uso dos aparatos pás ou cesta, variando-se as velocidades de agitação (BRASIL, 2002).

Geralmente, o volume do meio de dissolução é de 500, 900 ou 1000 mL. As condições *sink* são desejáveis, mas não mandatórias. Todos os testes de dissolução para formas farmacêuticas de liberação imediata devem ser conduzidos a 37 ± 0,5 °C. As condições de agitação são geralmente brandas, para que se mantenha o poder discriminativo do teste na detecção de produtos de baixa *performance in vivo*. Utilizando o aparato da cesta, as velocidades de agitação mais comuns estão entre 50 e 100 rpm, enquanto com o aparato da pá, entre 50 e 75 rpm (SHAH *et al.*, 1992; FDA, 1997).

O meio de dissolução preferível é a água (embora algumas condições como tensão superficial e pH possam variar conforme a procedência da mesma). Soluções de HCl 0,1N e tampões com pH entre 1,2 e 6,8 (tampões farmacopéicos) também podem ser utilizados (MARCOLONGO, 2003; FDA, 1997).

Para avaliar o perfil de dissolução dos comprimidos de mesilato de imatinibe foi estabelecido o volume da cuba de 900 mL à temperatura de 37 °C. Nestas condições, a partir do conhecimento da solubilidade do fármaco descrita na literatura (altamente solúvel em água (>100 g/L) em pH 4,2, moderadamente solúvel em pH 7,4 (≈49 mg/L) e quase insolúvel em pH 8,0 (THE MERCK INDEX THIRTEEN EDITION, 2001), foi possível trabalhar nas condições *sink*.

As **Figuras 13, 14 e 15** mostram o perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe em três diferentes meios de dissolução, dois tipos de aparatos e três velocidades de agitação.

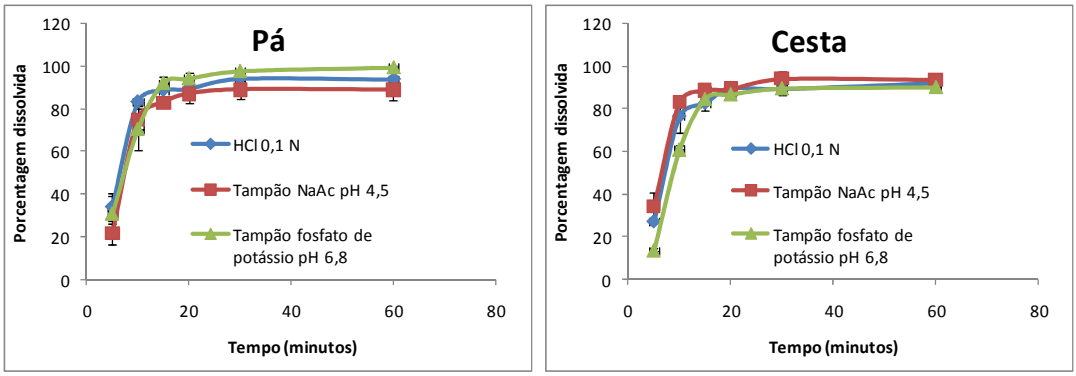

Figura 13 - Perfil de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe (100 mg). Velocidade de agitação: 50 rpm. Os valores correspondem à média de três determinações e as barras representam os desvios padrão

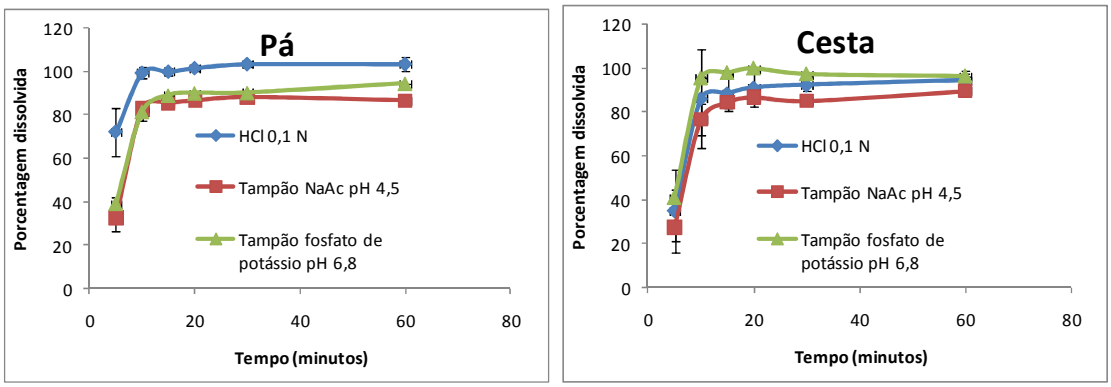

Figura 14 - Perfil de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe (100 mg). Velocidade de agitação: 75 rpm. Os valores correspondem à média de três determinações e as barras representam os desvios padrão

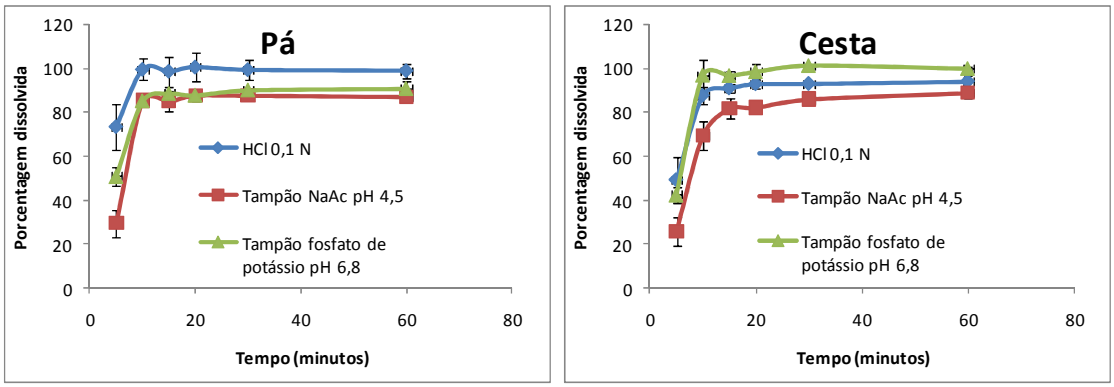

Figura 15 - Perfil de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe (100 mg). Velocidade de agitação: 100 rpm. Os valores correspondem à média de três determinações e as barras representam os desvios padrão

A análise estatística através da análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, com um intervalo de confiança de 95%, não indicou diferenças significativas entre as diferentes condições em que foi realizado o teste.

A partir dos perfis de dissolução obtidos, que relacionam porcentagem do fármaco dissolvido *versus* tempo, é possivel avaliar formas farmacêuticas antes dos testes clínicos. Qualquer fator que afete ou altere os processos de desagregação ou dissolução poderá afetar diretamente a biodisponibilidade, expressa em termos de quantidade de fármaco absorvido e velocidade do processo de absorção (STORPIRTIS, 1999). Como observado pelas figuras apresentadas acima, em aproximadamente 15 minutos, cerca de 80-90% do fármaco já estava todo dissolvido no meio de dissolução. Estes dados obtidos estão em acordo com a forma farmacêutica em questão, ou seja, de liberação imediata, uma vez que foi verificada liberação de grande quantidade do fármaco em um curto período de tempo.

Assim, devido à rápida dissolução do fármaco e à incapacidade preditiva dos modelos cinéticos, foi calculada a eficiência de dissolução como parâmetro comparativo entre as diferentes condições avaliadas no teste de dissolução.

Além de modelos cinéticos traçados a partir do perfil de dissolução, a eficiência de dissolução (ED%) sugerida inicialmente por Khan e Rhodes (1975) pode ser incluída como um importante parâmetro de cinética de dissolução e permite comparar, adequadamente, os perfis de dissolução de fármacos. Além disso, este parâmetro está relacionado com a quantidade real de fármaco que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo* (SERRA; STORPIRTIS, 2007; SKOUG *et al.*, 1997; OFOEFULE; UDEOGARANYA; OKONTA , 2001). Os resultados do percentual de eficiência de

dissolução para cada condição avaliada, em triplicata, estão descritas nas **Tabelas 16 e 17**.

Tabela 16 – Valores de ED% para os comprimidos de mesilato de imatinibe obtidos com o aparato da pá

Velocidade de agitação	Meio de dissolução		
	HCl %	NaAc %	PO_4 %
50	85,20 (±0,65)	79,95 (±1,29)	84,09 (±1,03)
75	92,55* (±0,97)	78,80 (±1,74)	81,75 (±1,52)
100	92,10* (±1,73)	80,35 (±1,66)	82,56 (±0,13)

*valores estatisticamente significativos em relação a velocidade de 50 rpm (P<0,05)

Tabela 17 – Valores de ED% para os comprimidos de mesilato de imatinibe obtidos com o aparato da cesta

Velocidade de agitação	Meio de dissolução		
	HCl %	NaAc %	PO_4 %
50	79,64 (±1,73)	82,94 (±1,28)	79,41 (±3,00)
75	81,73 (±2,21)	77,62* (±0,89)	89,33* (±0,97)
100	84,02 (±1,05)	75,33* (±0,77)	91,19* (±1,54)

*valores estatisticamente significativos em relação a velocidade de 50 rpm (P<0,05)

De acordo ccom os resultados apresentados nas tabelas 16 e 17 pode-se verificar que a velocidade de agitação influenciou a eficiência de dissolução dos comprimidos de mesilato de imatinibe. Quando foi utilizado o aparato da pá, diferenças significativas entre as velocidades de agitação foram observadas em relação ao meio de dissolução de HCl. Nos outros meios de dissolução não foram observadas diferenças em relação à velocidade de agitação. Entretanto, quando foi utilizado o aparato da cesta (**Tabela 17**), diferenças significativas entre as velocidades de agitação foram observadas quando foram avaliados meios de dissolução com maiores valores de pH (NaAc pH 4,5 e Fosfato pH 6,8). Isto pode ser explicado pela solubilidade do fármaco em estudo e pela velocidade de agitação, uma vez que a taxa de dissolução é diretamente afetada pela velocidade de agitação (MARCOLONGO, 2003). Apesar do mesilato de imatinibe ser menos solúvel em valores de pH maiores (THE MERCK INDEX THIRTEEN EDITION,

2001), a agitação produzida pelo aparato da pá garantiu uma eficiência de dissolução semelhante utlizando as velocidades de agitação de 50, 75 ou 100 rpm. Portanto, o aparato da pá proporcionou uma melhor solubilização do fármaco, independentemente da velocidade de agitação. Assim, podemos sugerir que a condição mais adequada para avaliar o perfil *in vitro* de dissolução de comprimidos de mesilato de imatinibe é o meio de dissolução HCl 0,1 N, aparato da pá e as velocidades de 75 ou 100 rpm.

5 – CONCLUSÕES

Para a quantificação do mesilato de imatinibe foi necessário o desenvolvimento e a validação de um método analítico. As análises foram realizadas empregando uma coluna de fase reversa C18 Gemini Phenomenex®. Foi utilizada uma fase móvel composta por tampão acetato de sódio pH 3,0:metanol (40:60 v/v). O método desenvolvido apresentou características de desempenho adequadas para as análises pretendidas, tais como, linearidade (r=0,9993), precisão (CV <2%), exatidão (próximo a 100%), seletividade, limite de quantificação (10,0 µg/mL), robustez e estabilidade.

A avaliação do perfil *in vitro* da dissolução dos comprimidos de mesilato de imatinibe realizada em diferentes condições mostrou que a forma farmacêutica em questão é de liberação imediata, uma vez que foi verificada liberação de grande quantidade do fármaco em um curto período de tempo.

Baseado nos resultados obtidos na eficiência de dissolução, em relação à porcentagem do fármaco liberado, a condição mais adequada para avaliar o perfil *in vitro* de dissolução é o meio de dissolução HCl 0,1 N, aparato da pá e velocidade de agitação de 75 ou 100 rpm.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H.M. Dissolution. **Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company. 554p., 1989.

ADAMS, E.; COOMANS, D.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L. Application of linear mixed effects models to the evaluation of dissolution profiles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.226, p.107-125, 2001.

AGUIAR, F.A. Caracterização das propriedades do estado sólidodo diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico, 2009. 104f. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

AGUIAR, G.; FARIA, L.G., FERRAZ, H.G.; SERRA, C.H.R.; PORTA, V. Avaliação biofarmacotécnica *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. **Revista Brasileira de Ciencias Farmacêuticas** vol. 41, n.4, p.451-458, 2005.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

BAKHTIAR, R.; KHEMANI, L.; HAYES, M.; BEDMAN, T.; TSE, F. Quantification of the anti-leukemia drug STI571 (Gleevec™) and its metabolite (CGP 74588) in monkey plasma using a semi-automated solid phase extraction procedure and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v.28, p.1183–1194, 2002b.

BAKHTIAR, R.; LOHNE, J.; RAMOS, L.; KHEMANI, L.; HAYES, M.; TSE, F. High-throughput Quantification of the anti-leukemia drug STI571 (Gleevec™) and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.768, p.325-340, 2002a.

BERGANTINI, A.P.F.; CASTRO, F.A.; SOUZA, A. M.; FETT-CONTE, A.C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v.27, p.120-125, 2005.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 483, de 19 de Março de 2002. Recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 mar. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 893, de 29 de maio de 2003. Guia para realização de alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 nov. 2003a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun. 2003b.

BRECCIA, M.; ALIMENA, G. Nilotinib: A second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v.34, p.129-134, 2010.

CHOPRA ,R.; PU, Q.Q.; ELEFANTY, A.G. Biology of BCR-ABL. **Blood Reviews,** v.13, p.211-229, 1999.

CID, E.C. **Cinética de dissolución de medicamentos.** Washington: Organización de los Estados Americanos. 102 p., 1981.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de Cromatografia.* 2ª Ed; Campinas: Editora UNICAMP, 2006.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences,** v.13, p.123 –133, 2001.

DALEY, G.Q.; VAN ETTEN, R.A.; BALTIMORE, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. **Science**, v.247, p.824-830, 1990.

DE FRANCIA, S.; D'AVOLIO A.; DE MARTINO F.; PIRRO E.; BAIETTO L.; SICCARDI M.; SIMIELE M.; RACCA S.; SAGLIO G.; DI CARLO F.; DI PERRI, G. New HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v.877, p.1721–1726, 2009.

DRESSMAN, J. B.; AMIDON, G. L.; REPPAS, C.; SHAH, V. P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p.11-22, 1998.

DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; RESTA, D.J.; PENG, B.; BUCHDUNGER, E.; FORD, J.M.; LYDON, N.B.; KANTARJIAN, H.; CAPDEVILLE, R.; OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C.L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine,** v.344, p.1031-1037, 2001.

DRUKER, B.J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G.M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nature Medicine,** v.2, p.561-566, 1996.

DUSHEIKO, G. Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. **Hepatology,** v.26, p.112S-121S, 1997.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; KANTARJIAN, H. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. **Annals of Internal Medicine,** v.131, p.207-219, 1999.

GAMBACORTI-PASSERINI, C.; LE COUTRE, P.; MOLOGNI, L.; FANELLI, M.; BERTAZZOLI, C.; MARCHESI, E.; DINICOLA, M.; BIONDI, A.; COMEO, G.M.; BELOTTI, D.; POGLIANI, E.; LYDON, N.B. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. **Blood Cells, Molecules and Diseases,** v.23, p.380-394, 1997.

GIBALDI, M.; FELDMAN, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations – theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.56, p.1238-1242, 1967.

GOLDMAN, J.M.; MELO, J.V. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. **The New England Journal of Mededicine,** v.349, p.1451-1464, 2003.

GUETENS, G.; PRENEN, H.; DE BOECK, G.; VAN OOSTEROM, A.; SCHÖFFSKI, P.; HIGHLEY, M.; DE BRUIJN, E.A. Simultaneous determination of AMN107 and Imatinib (Gleevec®, Glivec®, STI571) in cultured tumour cells using an isocratic high-performance liquid chromatography procedure with UV detection. **Journal of Chromatography B**, v.846, p.341–345, 2007.

Guidance for industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville: FDA, 1997

HAOUALA, A.; ZANOLARI, B.; ROCHAT, B.; MONTEMURRO, M.; ZAMAN, K.; DUCHOSAL, M.A.; RIS, H.B.; LEYVRAZ, S.; WIDMER, N.; DECOSTERD, L.A. Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography B,** v.877, p.1982-1996, 2009.

HEHLMANN, R.; BERGER, U.; PFIRRMANN, M.; HOCHHAUS, A.; METZGEROTH, G.; MAYWALD, O.; HASFORD, J.; REITER, A.; HOSSFELD, D.K.; KOLB, H.J.; LOFFLER, H.; PRALLE, H.; QUEIBER, W.; GRIESSHAMMER, M.; NERL, C.; KUSE, R.; TOBLER, A.; EIMERMACHER, H.; TICHELLI, A.; AUL, C.; WILHELM, M.; FISCHER, J.T.; PERKER, M.; SCHEID, C.; SCHENK, M.; WEIB,J.; MEIER, C.R.; KREMERS, S.; LABEDZKI, L.; SCHMEISER, T.; LOHRMANN, H.P.; HEIMPEL, H.; German CML-Study Group. Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. **Leukemia,** v.17, p.1529-1537, 2003.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia, **Lancet,** v.370, p.342-350, 2007.

HEISTERKAMP, N.; JENSTER, G.; TEN HOEVE, J.; ZOVICH, D.; PATTENGALE, P.K.; GROFFEN, J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. **Nature**, v.344, p.251-253, 1990.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão:1, Março/2003. 35p

ISHII, K.; SAITOU, Y.; YAMADA, R.; ITAI, S.; NEMOTO, M. Novel approach for determination of correlation between *in vivo* and *in vitro* dissolution using the

optimization technique. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.44, p.1550-1555, 1996.

IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; JANCIC, B.; MALENOVIC, A. Reversed-phase liquid chromatography analysis of imatinib mesylate and impurity product in Glivec capsules. **Journal of Chromatography B**, v.800, p.253–258, 2004.

KANTARJIAN, H.M.; CORTES, J. E.; O'BRIEN, S.; LUTHRA, R.; GILES, F.; VERSTOVSEK, S.; FADERL, S.; THOMAS, D.; GARCIA-MANERO, G.; RIOS, M.B.; SHAN, D.; TALPAS, M. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. **Blood,** v.104, p.1979-1988, 2004.

KANTARJIAN, H.M.; GILES, F.J.; O'BRIEN, S.M.; TALPAZ, M. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. **Hematology/Oncology Clinics of North America,** v.12, p.31-80, 1999.

KASSIN, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E; STAVICHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmacology**, v.1, p.85-96, 2003.

KHAN, K.A; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency**. Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.27, p.48- 49, 1975.

KRÄMER, J. **Dissolution Testing**. Taylor & Francis Group, LLC. 2005, 419p.

KRAUSE, D.S.; VAN ETTEN ,R.A. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. **The** *New England Journal of Medicine,* v**353,** p.172–187, 2005.

Leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia – Condutas do INCA**, v.49, p.5-8, 2003.

LUGO, T.G.; PENDERGAST, A.M.; MULLER, A.J.; WITTE, O.N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. **Science**, v.247, p.1079-1982, 1990.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F.A. Dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p.375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. Drug products dissolution: principles, applications, regulatory aspects and perspectives in the pharmaceutical área, 2003. 117f. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARQUES, M.R.C; BROW, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica,** n.1, p.48-51, 2002.

MARTINELLO, V.C.A.; SERRA, C. H. R. Estudo de dissolução de cápsulas contendo itraconazol: desenvolvimento e validação de método. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, p.93-99, 2008.

MEDENICA, M.; JANCIC, B.; IVANOVIC, D.; MALENOVIC, A. Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity. **Journal of Chromatography A**, v.1031, p.243–248, 2004.

MELO, J.V.; BARNES, D.J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer*,* **Nature**, v.7, p.441-450, 2007.

MOORE, J.W.; FLANNER, H.H. Mathematical comparison of dissolution profiles. **Pharmaceutical Technology**, v.20, p.64-74, 1996.

NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração de ensaios. ABNT, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

O'DWYER, M. Multifaceted approach to the treatment of Bcr-Abl-positive leukemias. **The Oncologist**, v.7, p.30-38, 2002.

O'HARA, T.; DUNNE, A; BUTLER, J.; DENAVE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1, p.214-223, 1998.

Official methods of analysis of AOAC International. AOAC Internacional, 2vols, 16th ed, 1995.

OFOEFULE, S.I.; UDEOGARANYA, P.O.; OKONTA, J.M. Prediction of *in vivo* bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE*).* **Bollettino chimico farmaceutico**, v.140, p.187-191, 2001.

PARISE, R.A.; RAMANATHAN, R.K.; HAYES, M.J.; EGORIN, M.J. Liquid chromatographic–mass spectrometric assay for quantitation of imatinib and its main metabolite (CGP 74588) in plasma. **Journal of Chromatography B**, v.791, p.39-44, 2003.

PENG, B.; LLOYD, P.; SCHRAM, H. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib. **Clinical Pharmacokinetics,** v.44, p.879-894, 2005.

PENG, G.W.; CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetics studies. **Journal of Chromatography**, v.531, p.3-50, 1990.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Information Journal,** v.30, p.113-120, 1996

PURSCHE, S.; OTTMANN, O.G.; EHNINGER, G.; SCHLEYER, E. High-performance liquid chromatography method with ultraviolet detection for the quantification of the BCR-ABL inhibitor nilotinib (AMN107) in plasma, urine, culture medium and cell preparations. **Journal of Chromatography B**, v.852, p.208–216, 2007.

QUATTROCCHI, O.A.; ANDRIZZI, S.A.; LABA, R.F. Solventes. **In: Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro, cap. 04, p.65-88, 1992.

REN, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. **Nature Reviews Cancer,** v.5, p.172-183, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v.27, p.771-780, 2004.

ROBINSON, D.R.; WU, Y.M.; LIN, S.F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Oncogene,** v.19, p.5548-5557, 2000.

ROSASCO, M.A.; MOYANO, M.A.; PIZZORNO, M.T.; SEGALL, A.I. Validation of an HPLC Method for the Determination of Imatinib Mesylate in Pharmaceutical Dosage - **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.28, p.3283–3292, 2005.

ROWLEY J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v.243, p.290-293, 1973.

SAVAGE, D.G.; ANTMAN, K.H. Imatinib mesylate: a new oral targeted therapy. **The New England Journal of Medicine,** v.346, p.683-693, 2002.

SAWYERS, C.L. Chronic Myeloid Leukemia. **The New England Journal of Medicine,** v.340, p.330-340, 1999.

SCHINDLER, T.; BORNMANN, W.; PELLICENA, P.; MILLER, W.T.; CLARKSON, B.; KURIYAN, J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. **Science**. v.289, p.1938-1942, 2000.

SERRA, C.H.R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p.79-89, 2007.

SHAH, V.P.;GURBARG, M.; NOORY, A.; DIGLE, S.; SKELLY, J.P. Influence of Higher Rate of Agitation on Release Patterns of Immediate Release Drug Products. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.81, p.500-503, 1992.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry,* Seventh Edition; Saunders College Publishing:United States of America, 1996.

SKOUG, J.W.; HALSTEAD, G.W.; THIES, D.L.; FREEMAN, J.E.; FAGAM, D.T.; ROHRS, B.R. Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, n.1, p.34-43, 1997.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p.515-527, 2007.

SOUZA, M. C. Microencapsulação do sulfóxido de albendazol: uma estratégia para otimização da terapia das parasitoses, 2009. 72f. **Dissertação de Mestrado -** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo: s.n, 1999, 78p.

SZCZEPEK, W.J.; KOSMACINSKA, B.; BIELEJEWSKA, A.; ŁUNIEWSKI, W.; SKARZYNSKI, M.; ROZMARYNOWSKA, D. Identification of imatinib mesylate degradation products obtained under stress conditions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.1682–1691, 2007.

TABAK, D.G. Transplante de medula óssea em leucemia mielóide crônica. **Medicina, Ribeirão Preto,** v.33, p.232-240, 2000.

The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia, Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine,** v.330, p.820-825, 1994.

THE MERCK INDEX THIRTEEN EDITION, Merck & Co. Inc. Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2001.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 30th revision, The United States Pharmacopeial Convention: 2007

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 32th revision, The United States Pharmacopeial Convention: 2009

United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24,* Validation of Compendial Methods*,* Rockville, 1999. 1225p.

VARELAS, C.G.; DIXON, D G.; STEINER, C.A. Zeroorder release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Controlled Release***,* v.34, p.185-192, 1995.

VIVEKANAND, V.V.; RAO, D.S.; VAIDYANATHAN, G.; SEKHAR, N.M.; KELKAR, S.A.; PURANIK, P.R. A validated LC method for imatinib mesylate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v.33, p.879-889, 2003.

WAGNER, J.G. Interpretation of percent dissolved-time plots derived from In vitro testing of conventional tablets and capsules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, p.1253-1257, 1969.

_____

Mestrando: **Thiago Branco Hanna**

_____

Orientadora: **Profª Dr^{a} Cristiane Masetto de Gaitani**