

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise do mesilato de imatinibe em plasma empregando a
eletroforese capilar**

Tatiana Okura Ajimura

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise do mesilato de imatinibe em plasma empregando a
eletroforese capilar**

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

Orientada: Tatiana Okura Ajimura

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ajimura, Tatiana Okura

Análise do mesilato de imatinibe em plasma empregando a eletroforese capilar. Ribeirão Preto, 2010.

83 p.; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Gaitani, Cristiane Masetto de

1. eletroforese capilar. 2. mesilato de imatinibe 3. plasma.
4. validação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tatiana Okura Ajimura

Análise do mesilato de imatinibe em plasma empregando a eletroforese capilar

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

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus, com gratidão por suas bênçãos e proteção a mim concedidas.

A meus pais e irmãos, pelo incondicional amor, apoio e crença indubitável em minha capacidade de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles, que de qualquer forma, contribuíram para a realização deste trabalho:

A Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani, tanto pela orientação científica como também pela amizade, apoio e confiança.

A Profa. Dra. Pierina Sueli Bonato, por permitir a utilização da excelente estrutura técnica do Laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar (CROEC).

A Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro, por ceder gentilmente o padrão analítico do fármaco e por contribuir na elaboração deste trabalho.

As professoras, Dra. Juliana Maldonado Marchetti e Dra. Maria Vitória L. B. Bentley, por disponibilizar espaço físico para a realização de alguns experimentos.

A todos os membros do CROEC, Fernando, Keyller, Leandro, Luciana, Roberto, Rodrigo, Thiago e Valquíria, que me trataram como parte integrante daquele laboratório e contribuíram efetivamente para a realização de meu trabalho.

A todos os membros do laboratório de Controle de Qualidade, Aline, Ellen, Fernando, Ivelise, Jennifer, Luís Fernando, Luriene, Maíra e Thiago, pelas discussões científicas, pelo convívio e amizade.

A todos os membros do Laboratório de Farmacotécnica, pela atenção e ajuda.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A meus pais, irmãos, amigos e namorado, por acreditarem em minha capacidade de concluir este estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

AJIMURA, T. O. **Análise do mesilato de imatinibe em plasma empregando a eletroforese capilar.** 2010. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O mesilato de imatinibe é um importante fármaco pertencente à classe dos inibidores da tirosina-quinase, desenvolvido e utilizado atualmente no tratamento da Leucemia Mielóide Crônica. No histórico da utilização deste medicamento, casos de resistência tem sido relatados cujos mecanismos envolvidos, além dos mecanismos celulares, podem estar relacionados ao metabolismo aumentado deste fármaco. O imatinibe é metabolizado principalmente pelo CYP 3A4, cuja atividade enzimática apresenta grande variabilidade interindividual e é suscetível a indução ou inibição por inúmeras co-medicações, constituintes ambientais e dietéticos. Sendo assim uma dose do medicamento pode resultar em concentrações plasmáticas muito diferentes entre pacientes. A maior parte dos métodos existentes para a determinação do imatinibe em amostras biológicas utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, o método desenvolvido e validado neste trabalho propôs a utilização da eletroforese capilar para a análise deste fármaco em plasma. Para isto foi utilizado um capilar de sílica fundida (46,5 cm de comprimento total, 38 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno), tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5 como eletrólito de corrida, injeção hidrodinâmica por 20 s a pressão de 50 mbar, tensão de 30 kV, temperatura de 35 °C e detecção em 200 nm. O procedimento de preparo das amostras foi baseado na extração líquido-líquido com o éter metil-*tert*-butílico como solvente extrator. Os parâmetros de desempenho analítico, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação, seletividade e estabilidade, avaliados na validação do método, cumpriram os requisitos preconizados na legislação vigente e o método desenvolvido foi validado com sucesso. Além disso, sua aplicação foi demonstrada na análise de amostras de plasma de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica.

Palavras-chave: eletroforese capilar, mesilato de imatinibe, extração líquido-líquido, plasma, validação.

ABSTRACT

AJIMURA, T.O. **Determination of imatinib mesylate in plasma by capillary electrophoresis.** 2010. 83f. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Imatinib mesylate is an important tyrosine kinase inhibitor that has been used for the treatment of Chronic Myeloid Leukemia (CML). Despite the efficacy of imatinib therapy, some cases of treatment resistance have been described. A number of mechanisms of resistance have been identified, which include innate or acquired mutations in the BCR-ABL gene, imatinib binding to α_1 -acid glycoprotein and altered imatinib pharmacokinetics. Imatinib is mainly metabolized by CYP 3A4, whose enzymatic activity presents a large inter-individual variability and is susceptible to induction or inhibition by numerous co-medications, environmental and dietary constituents. Therefore a given dose can yield very different circulating concentrations between patients. The major of methods available for the determination of imatinib in biological samples apply high performance liquid chromatography as analytical technique. However, in this work, we developed and validated a method by capillary electrophoresis for the determination of this drug in human plasma. The analysis was performed using a fused silica capillary (50 μm internal diameter x 46.5 cm total length, 38.0 cm effective length), a 50 mmol/L sodium phosphate buffer pH 2,5 as background electrolyte, hydrodynamic injection time of 20s (50 mbar), voltage of 30 kV, capillary temperature of 35°C and detection at 200 nm. Plasma samples pre-treatment involved liquid-liquid extraction with methyl-*tert*-butyl ether as extractor solvent. The analytical parameters investigated, linearity, precision, accuracy, recovery, limit of quantification, selectivity and stability, presented in accordance with the confidence criteria established in the literature. Furthermore the application of the method was performed in the analysis of plasma samples from CML patients undergoing treatment with imatinib.

Keywords: capillary electrophoresis, imatinib mesylate, liquid-liquid extraction, plasma, validation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Métodos para análise do imatinibe em material biológico encontrados na literatura.....	18
Tabela 2- Condições finais selecionadas para análise do imatinibe em plasma por CE.....	44
Tabela 3- Limite de quantificação do método para análise do imatinibe em plasma.....	47
Tabela 4- Recuperação do método para análise do imatinibe em plasma.....	48
Tabela 5- Precisão intra e interensaio do método para análise do imatinibe em plasma.....	49
Tabela 6- Exatidão intra e interensaio do método para análise do imatinibe em plasma.....	49
Tabela 7- Estabilidade do imatinibe em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento.....	50
Tabela 8- Estabilidade do imatinibe em plasma após armazenagem de longa duração (7 dias).....	50
Tabela 9- Estabilidade do imatinibe em plasma após armazenagem de curta duração (12 horas).....	51
Tabela 10- Determinação da concentração plasmática de imatinibe em plasma de pacientes portadores de LMC em tratamento com Glivec.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um equipamento de CE	05
Figura 2. Representação do modelo da dupla camada	09
Figura 3. Representação da separação por CE	11
Figura 4. Perfil de velocidade radial de fluxo parabólico como em HPLC e linear como em CE	11
Figura 5. Translocação t(9;22).....	12
Figura 6. Estrutura química do mesilato de imatinibe e seu principal metabólito (CGP 74588).....	15
Figura 7. Mecanismo de ação	15
Figura 8. Procedimento de preparo das amostras de plasma para análise do imatinibe por CE.....	26
Figura 9. Espectro de absorção do mesilato de imatinibe em metanol na região do ultravioleta	33
Figura 10. Eficiência de extração dos solventes orgânicos utilizados na extração do imatinibe a partir de amostras de plasma.	42
Figura 11. Tempos de migração do imatinibe e PI ao longo de dez corridas consecutivas.	44
Figura 12. Eletroferograma de plasma enriquecido com 1 µg/mL de imatinibe e 1,25 µg/mL de PI.....	45
Figura 13. Curva de calibração referente à linearidade do imatinibe no intervalo de concentração plasmática 0,125 a 5,00 µg/mL.....	46
Figura 14. Eletroferograma referente às amostra de plasma branco e plasma enriquecido com imatinibe e PI.....	52
Figura 15. Eletroferograma de amostra de plasma de paciente (dosagem de 400 mg de Glivec).....	54
Figura 16. Espectro de absorção correspondente ao pico desconhecido (vermelho) e ao pico do imatinibe (azul).....	55

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Eletroforese Capilar.....	2
1.1.1. Histórico	3
1.1.2. Instrumentação.....	4
1.1.3. Injeção.....	6
1.1.4. Detecção	7
1.1.5. Fundamentos teóricos	8
1.2. Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	12
1.3. Mesilato de imatinibe.....	14
1.3.1. Análise do mesilato de imatinibe	17
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Seleção das condições de análise do imatinibe por CE.....	21
3.1.1. Padrão, reagentes e solventes	21
3.1.2. Capilar	21
3.1.3. Equipamentos	22
3.1.4. Determinação do espectro de absorção do mesilato de imatinibe	22
3.1.5. Análise do mesilato de imatinibe por CE	23
3.2. Desenvolvimento de método para análise do imatinibe em plasma.....	23
3.2.1. Padrão, reagentes e solventes	23
3.2.2. Soluções-padrão	24
3.2.3. Capilar	24
3.2.4. Plasma	25
3.2.5. Equipamentos	25

3.2.6. Procedimento de preparo da amostra	25
3.2.7. Seleção do solvente de extração	27
3.2.8. Seleção do PI	27
3.3. Validação.....	28
3.3.1. Calibração e Linearidade.....	28
3.3.2. Limite de Quantificação (LQ).....	28
3.3.3. Recuperação	29
3.3.4. Precisão e Exatidão	29
3.3.5. Estabilidade.....	30
3.3.5.1. Estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento	30
3.3.5.2. Estabilidade de curta duração	31
3.3.5.3. Estabilidade de longa duração	31
3.3.6. Seletividade	32
3.4. Aplicação do método desenvolvido e validado	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Seleção das condições de análise do imatinibe por CE.....	33
4.1.1. Espectrofotometria de absorção do mesilato de imatinibe	33
4.1.2. Seleção do eletrólito de corrida.....	34
4.1.3. Capilar	35
4.1.4. Injeção e concentração da amostra	37
4.1.5. Temperatura.....	38
4.1.6. Voltagem aplicada/Corrente	39
4.2. Desenvolvimento de método para análise do imatinibe em plasma.....	39
4.2.1. Procedimento de preparo da amostra	39
4.2.2. Seleção do solvente de extração	41
4.2.3. Seleção do PI	42
4.2.4. Capilar	43
4.3. Validação do método	45
4.3.1. Curva de calibração e Linearidade	46
4.3.2. Limite de Quantificação (LQ)	47
4.3.3. Recuperação	47
4.3.4. Precisão e Exatidão	48

4.3.5. Estabilidade	50
4.3.6. Seletividade	51
4.4. Aplicação do método desenvolvido e validado	53
5. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fármacos mais seletivos e eficazes ampliou a necessidade de melhor compreensão de seus efeitos terapêuticos e tóxicos. Neste contexto, a análise de fármacos em fluidos biológicos e em formulações farmacêuticas é relevante, visto que auxilia na otimização da farmacoterapia e serve de base para estudos sobre biodisponibilidade e farmacocinética, overdose de fármacos, adesão ao tratamento, influência de co-medicações e outros (KATAOKA, 2003; MEHTA, 1995).

O mesilato de imatinibe é um fármaco utilizado no tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) uma doença proliferativa do sistema hematopoiético. Este fármaco tem fornecido excelentes resultados na terapia dos pacientes, induzindo altas taxas de remissão e aumento de sobrevida livre da doença se comparado aos demais medicamentos disponibilizados para LMC (APPERLEY, 2007).

O mesilato de imatinibe é metabolizado principalmente pelo Citocromo P-450 3A4 (CYP3A4) (COHEN et al., 2002), cuja atividade enzimática apresenta grande variabilidade interindividual e é suscetível a indução ou inibição por inúmeras co-medicações, constituintes ambientais e dietéticos (WIDMER et al., 2004). Além disso, no histórico da utilização deste medicamento tem sido relatados casos de resistência cujos mecanismos envolvidos, além dos mecanismos moleculares celulares, podem estar relacionados ao metabolismo aumentado deste fármaco (WIDMER et al., 2004).

A natureza polimórfica do CYP 3A4 e seu potencial de ser inibido ou induzido por outras substâncias fazem do imatinibe um bom candidato ao monitoramento terapêutico. Além disso, o desenvolvimento de um método para a determinação do imatinibe em plasma seria útil, por exemplo, para avaliar se a resistência ao tratamento poderia estar associada a alterações na farmacocinética deste fármaco.

Dentre as técnicas analíticas utilizadas para a determinação de fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas, além da cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*, HPLC), destaca-se também a eletroforese capilar.

Comparada a outras técnicas como eletroforese em gel, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada, a CE apresenta a versatilidade como vantagem, pois pode ser aplicável na separação de diferentes compostos (íons inorgânicos, moléculas orgânicas e macromoléculas) usando o mesmo instrumento. Além disso, na maioria dos casos, tanto a otimização do processo de separação quanto a mudança para outra técnica de eletromigração pode ser feita mantendo o mesmo capilar e alterando apenas a composição do tampão de análise (CRUCES-BLANCO; GÁMIZ-GRACIA; GARCÍA-CAMPAÑA, 2007; HADLEY et al., 2000; ISSAQ, 2000;).

Dentre outras características inerentes que tornam a CE atrativa como técnica de separação pode-se citar a alta eficiência, o menor de tempo nas análises, o alto poder de resolução e o baixo consumo de amostras e reagentes (BOONE et al., 1999; BORGES et al., 2007).

Assim, a proposta do presente projeto foi desenvolver e validar um método para a análise do mesilato de imatinibe utilizando a eletroforese capilar. Além disso, sua utilidade de aplicação foi demonstrada na análise de amostras de plasma de pacientes com LMC em tratamento com este fármaco.

1.1. ELETROFORESE CAPILAR

Eletroforese capilar (do inglês, *capillary electrophoresis*, CE) é uma técnica analítica de separação baseada nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos, no interior de um pequeno capilar, sob a influência de um campo elétrico (BOONE et al., 1999; SILVA et al., 2007).

Para realizar as análises, o capilar é primeiramente preenchido com uma solução tampão, também chamada de eletrólito de corrida (do inglês, *background electrolyte*, BGE) e a amostra é então introduzida na extremidade do capilar oposta ao detector (usualmente no ânodo). As extremidades são então mergulhadas nos reservatórios contendo os eletrodos de alta voltagem e a solução tampão. Um eletrodo é conectado a um cabo ligado a uma fonte de alta tensão enquanto o outro

é conectado a um cabo aterrado. A aplicação de voltagem ao longo do capilar causa movimentos eletrosmóticos e eletroforéticos resultando na movimentação das espécies iônicas e na passagem através do detector *online* (ALTRIA, 1996). Esta técnica de eletromigração em capilar também é conhecida como eletroforese capilar de zona (do inglês, *capillary zone electrophoresis*, CZE) ou eletroforese capilar em solução livre (do inglês, *free solution capillary electrophoresis*, FSCE) (SILVA et al., 2007).

Outras técnicas analíticas de eletromigração em capilares utilizadas para se alcançar a separação de analitos (SILVA et al., 2007) incluem:

- A) Eletroforese Capilar de Afinidade
- B) Eletroforese Capilar de Peneiramento
- C) Eletroforese Capilar em Gel
- D) Focalização Isoelétrica Capilar
- E) Isotacoforese Capilar
- F) Cromatografia Eletrocínética
- G) Cromatografia Eletrocínética Micelar
- H) Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão
- I) Eletrocromatografia Capilar

Dentre as principais vantagens da CE podemos citar a alta eficiência, sua versatilidade de aplicação (HADLEY et al., 2000), a demanda de pequenos volumes de amostra, o reduzido tempo de análise (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007), o consumo mínimo de solventes (o que reduz os prejuízos causados ao meio ambiente), o baixo custo dos materiais de consumo, a possibilidade de interface com outros sistemas de detecção, e a simplicidade da instrumentação básica (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996).

1.1.1. Histórico

A eletroforese como técnica analítica foi primeiramente introduzida por Tiselius em 1930 para separação das proteínas plasmáticas albumina e α -, β - e γ -globulina. Por este trabalho Tiselius recebeu o prêmio Nobel em 1948.

Em 1967, Hjertén demonstrou que era possível conduzir separações eletroforéticas em um tubo de vidro de 300 μm de diâmetro interno e detectar os compostos separados por absorção ultravioleta, sendo este modo de separação denominado de eletroforese de zona livre (ISSAQ, 2000). Entretanto a eletroforese capilar começou a tornar-se popular a partir de 1981 com o trabalho pioneiro de Jim Jorgenson e K. D. Lukacs, na Universidade da Carolina do Norte, que realizaram a eletroforese em capilares de vidro de 75 μm de diâmetro (JORGENSEN; LUKACS, 1981 apud O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

Em 1984, Terabe et al. (TERABE et al., 1984 apud LEHMANN; VOELTER; LIEBICH, 1997) introduziram a cromatografia eletrocínética micelar (do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) que permitiu a separação de espécies neutras e carregadas, adicionando surfactante ao tampão eletroforético. Em 1988, o primeiro instrumento foi comercializado e desde então sua utilização vem crescendo, sendo amplamente aplicada em diversos campos tais como na química analítica, química forense (ANASTOS, BARNETT, LEWIS, 2005), química orgânica, produtos naturais, indústria farmacêutica (AHUJA, 2008), separações quirais, biologia molecular e outras (ISSAQ, 2000).

1.1.2. Instrumentação

Os principais componentes de um equipamento de CE são: uma fonte de alta tensão, um capilar que passa através do centro óptico de um sistema de detecção conectado a um dispositivo de aquisição de dados, tampões para fechar o circuito, um sistema de introdução da amostra e um autoinjeter (ALTRIA, 1996; AHUJA, 2008). Tipicamente, um instrumento de CE é controlado por um computador (figura 1).

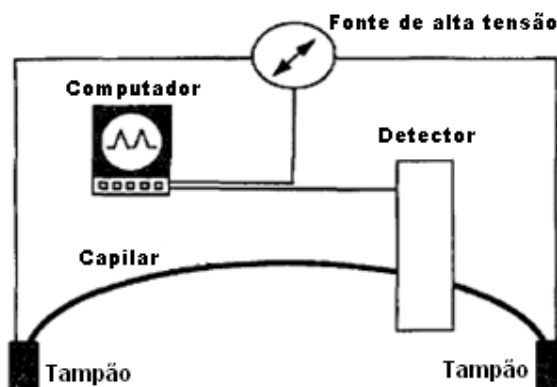


Figura 1. Representação esquemática de um equipamento de CE. Fonte: ALTRIA, K.D.; FABRE, H., 1995.

Nos equipamentos de CE, a fonte de alta tensão pode fornecer um potencial de até 50 kV e correntes de até 200 μ A. Alguns oferecem a opção de serem operados à voltagem constante e/ou corrente constante (TAVARES, 1996).

No modo de operação em polaridade normal tem-se o ânodo na extremidade de injeção do capilar e o cátodo próximo à extremidade de detecção, entretanto em condições especiais de análise a polaridade pode ser revertida (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1995).

Os capilares utilizados em CE são normalmente feitos de sílica fundida e suas dimensões típicas variam de 15 a 100 μ m de diâmetro interno e de 50 a 100 cm de comprimento (TAVARES, 1997). Quanto às características, estes devem ser física e quimicamente resistentes, baratos, transparentes ao UV, ter dimensões internas precisas, não ter tendência a adsorver solutos e ter alta condutividade térmica a fim de permitir a dissipação do aquecimento Joule (TAGLIARO, TURRINA, SMITH, 1996), que é o calor gerado em decorrência da passagem de corrente através do meio condutor.

Devido à influência da temperatura sobre a viscosidade das soluções e conseqüentemente sobre a injeção da amostra e sobre o tempo de migração, um fator importante a ser controlado é a termostatização do capilar. Este controle de temperatura reduz a variabilidade dos tempos de migração e das áreas dos picos e é feito nos equipamentos através do uso de sistema de convecção de ar ou de circulação de líquido refrigerante pelo capilar (MAYER, 2001).

Os capilares normalmente possuem um revestimento externo de polimida que os tornam flexíveis. Na região onde o capilar necessita ser opticamente transparente, ou seja, na janela óptica, este revestimento de polimida é queimado e removido a fim de permitir a detecção fotométrica, deixando uma parede frágil, porém altamente transparente ao UV.

1.1.3. Injeção

Em CE duas técnicas de injeção são mais comumente utilizadas: a injeção por pressão (hidrodinâmica) e a injeção eletrocinética (JIMIDAR, 2008). Ambas possuem vantagens e desvantagens e devem ser escolhidas de acordo com o tipo de aplicação do método (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

Na injeção hidrodinâmica uma pressão é aplicada por um determinado tempo no reservatório da amostra, no qual está mergulhada a extremidade de injeção do capilar, ou então vácuo é aplicado na extremidade oposta (TAGLIARO, TURRINA, SMITH, 1996). A amostra que adentra o capilar é independente de mobilidade e é exatamente representativa de sua composição (BREADMORE, 2009; O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

Na injeção eletrocinética um potencial é aplicado ao reservatório da amostra, que se encontra na extremidade de injeção do capilar, fazendo com que os analitos migrem para o interior deste. A quantidade de material injetado é uma função da mobilidade eletroforética do soluto, das condutividades da amostra e meio condutor, bem como da magnitude do fluxo eletrosmótico (TAVARES, 1996), ou seja, a injeção é seletiva. Este tipo de injeção pode ser útil quando o analito encontra-se na presença de interferentes (com diferentes mobilidades), em aplicações qualitativas, ou quando tampões viscosos ou géis são utilizados (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

Como há uma discriminação entre componentes da amostra com diferentes mobilidades, geralmente a injeção eletrocinética não é adequada para fins quantitativos (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008). Fatores que alterem o EOF, a força iônica e a composição da amostra, afetarão a quantidade de analito injetada. Além

disso, as amostras podem ser contaminadas por produtos de reação eletroquímica decorrentes da passagem de corrente pela solução da amostra durante a injeção (MAYER, 2001).

1.1.4. Detecção

O tipo de detector mais comum utilizado em CE é o detector UV-Vis (absorbância) (JIMIDAR, 2008; O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008; SNIEHOTTA et al., 2007; SWINNEY; BORNHOP, 2000;).

Em CE a detecção é tipicamente conduzida no capilar onde o caminho óptico da célula de detecção é determinado pelo diâmetro do capilar. Sendo assim, a maior desvantagem da CE, em geral, é o limite de detecção relativamente alto, consequência do limitado volume de amostra analisado e do reduzido comprimento do caminho óptico disponível quando se emprega a detecção no capilar (BONATO, 2003; MALLAMPATI et al., 2008).

Para superar esta limitação e melhorar a detectabilidade, duas estratégias podem ser aplicadas: aumentar a quantidade de analito introduzido no capilar e/ou aumentar a sensibilidade no sítio de detecção (HEMPEL, 2000).

Técnicas de detecção alternativas ao UV como a detecção por fluorescência induzida a laser (do inglês, *laser-induced fluorescence*, LIF) e a espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry*, MS) podem ser utilizadas para aumentar a detectabilidade no sítio de detecção. Outra abordagem seria aumentar o caminho óptico através do uso de capilares com células de detecção em forma de bulbo ou em forma de z (HEMPEL, 2000).

A quantidade de analito introduzido no capilar pode ser concentrada utilizando-se técnicas de pré-concentração *online* tais como o empilhamento da amostra (do inglês, *sample stacking*) ou a injeção por campo amplificado (do inglês *field-amplified sample injection*, FASI) (HEMPEL, 2000).

1.1.5. Fundamentos teóricos

Na eletroforese capilar os analitos são separados com base nas diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas, que resultam em diferentes velocidades de migração. A velocidade de migração (v) de uma partícula carregada em um campo elétrico depende de sua mobilidade eletroforética (μE) e do campo elétrico aplicado (E) (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996):

$$v = \mu E \cdot E \quad (1)$$

onde μE é descrita pela seguinte equação:

$$\mu E = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

onde q é a carga do íon, r é o raio iônico, η é a viscosidade da solução.

Observando a equação acima fica claro que o tamanho do íon e a carga são os principais fatores que influenciam a mobilidade iônica. Para ácidos e bases fracas, a carga depende dos valores individuais de pK e do pH do eletrólito de corrida (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996).

Outro fator operante em CE é a eletrosmose. Este fenômeno, decorrente da aplicação de voltagem ao longo do capilar preenchido com o tampão de análise, causa um fluxo eletricamente dirigido do líquido no capilar e é responsável por importantes aspectos do processo de separação (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996). O fluxo eletrosmótico (do inglês, *electroosmotic flow*, EOF) efetivamente impulsiona os solutos iônicos ao longo do capilar em direção ao detector e ocorre por causa da ionização dos grupos silanóis acídicos do interior das paredes do capilar quando em contato com o tampão de análise (ALTRIA, 1996; JIMIDAR, 2008).

Quando a sílica está em contato com uma solução aquosa, sua superfície se hidroliza formando grupos silanóis que podem estar positivamente carregados (SiOH_2^+), neutros (SiOH) ou negativamente carregados (SiO^-), dependendo do pH

da solução tampão de análise circundante. Em altos valores de pH estes grupos estão dissociados resultando em uma superfície negativamente carregada. Para manter a eletroneutralidade, os cátions do tampão de análise se aproximam da superfície formando uma dupla camada: uma fixa e uma difusa (figura 2). A camada fixa é formada por cátions fortemente atraídos pela superfície por forças eletrostáticas ou de coesão (adsorção específica). Com o distanciamento da superfície, a concentração destes cátions diminui, aproximando-se eventualmente da concentração dos íons na solução. Esta região é conhecida como camada difusa da dupla camada elétrica. Quando a voltagem é aplicada, os cátions da camada difusa migram em direção ao cátodo e as moléculas de água que os solvatam também se movem causando um fluxo em rede da solução ao longo do capilar (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007; TAVARES, 1996). Este efeito pode ser considerado como uma “bomba elétrica” (ALTRIA, 1996).

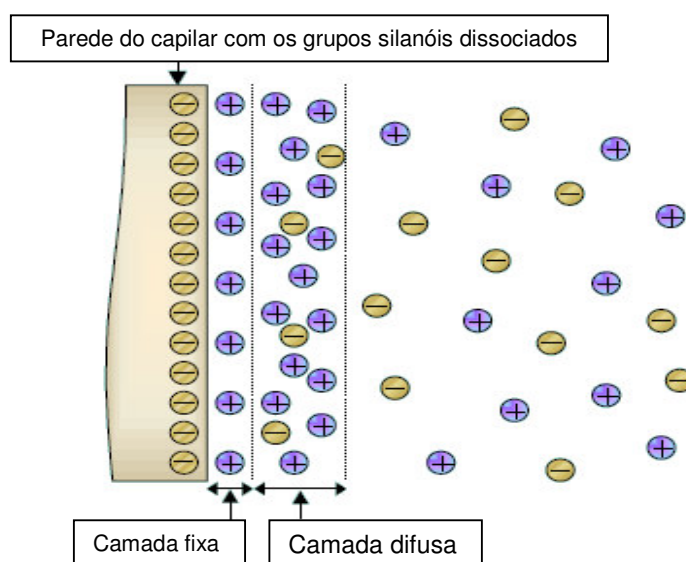


Figura 2. Representação do modelo da dupla camada. Fonte: www.bioscience.org

A extensão do fluxo está relacionada à carga na parede do capilar, e à viscosidade e constante dielétrica do meio (ALTRIA, 1996; FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007):

$$\mu_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) \quad (3)$$

onde, μ_{EOF} é a mobilidade eletrosmótica, ϵ é a constante dielétrica do tampão, ζ é o potencial zeta (carga na superfície do capilar) e η é a viscosidade do tampão.

A velocidade do EOF é altamente dependente do pH do eletrólito, já que o potencial zeta é grandemente governado pela ionização dos silanóis acídicos. Abaixo de pH 4 a ionização é pequena e a velocidade do EOF é insignificante, acima de pH 9 os grupos silanóis estão completamente ionizados e o EOF é forte. Além disso, o EOF diminui com o aumento da concentração do tampão de análise, já que o potencial zeta é reduzido (ALTRIA, 1996).

O tempo de migração total de um soluto está, portanto, relacionado à sua mobilidade eletroforética (μE) e ao EOF. O termo mobilidade aparente μA , é medido a partir do tempo de migração (t_m) e é a soma de μE e μ_{EOF} (ALTRIA, 1996):

$$\mu A = \mu E + \mu_{EOF} = (lL/t_m V), \quad (4)$$

onde l é o comprimento do capilar até o detector (comprimento efetivo em cm), V é a voltagem e L é o comprimento total do capilar.

De acordo com esta equação todos os íons migrarão na mesma direção se a velocidade do EOF for maior em magnitude e oposta em direção a todos os ânions no tampão. Além disso, espécies não iônicas serão carregadas pelo EOF e migrarão para uma das extremidades do capilar. Conseqüentemente, tanto ânions quanto cátions poderão ser separados na mesma corrida: os cátions serão atraídos em direção ao cátodo e suas velocidades serão aumentadas pelo EOF; os ânions, apesar de eletroforicamente atraídos pelo ânodo, serão arrastados em direção ao cátodo pelo EOF (LI, 1993).

Sob estas condições, cátions com a maior relação carga/massa migrarão primeiro, seguidos dos cátions com menores relações. Todos os compostos neutros migrarão juntos sem serem resolvidos, já que sua relação carga/massa é zero. Finalmente, os ânions com menor relação carga/massa migrarão antes daqueles com maior relação (LI, 1993), como demonstrado pela figura 3.

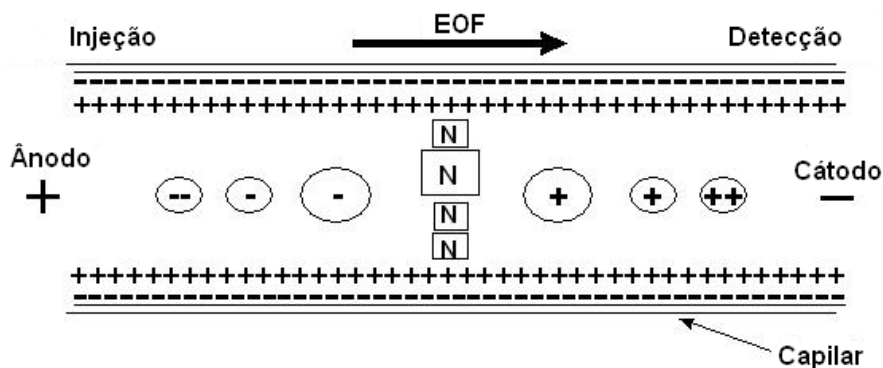


Figura 3. Representação da separação por CE. Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. Fonte: www.doping.chuv.ch

Uma característica significativa do EOF é seu perfil linear de velocidade radial (figura 4), não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas. Isto difere a CE da cromatografia em fase líquida que apresenta um perfil parabólico de velocidade radial dentro da coluna, característico dos fluxos induzidos por pressão (LI, 1993; TAVARES, 1996).

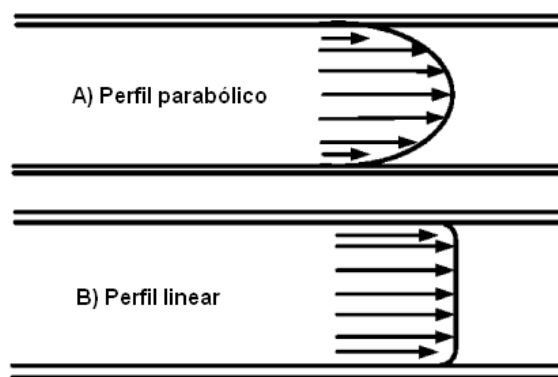


Figura 4. Perfil de velocidade radial de fluxo parabólico (A) como em HPLC e linear (B) como em CE. Fonte: JIMIDAR, M.I., 2008.

1.2. LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)

A LMC é uma doença mieloproliferativa crônica com incidência de um a dois casos por cem mil pessoas a cada ano e é mais comum em adultos com idade média de 65 anos (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

A LMC caracteriza-se pela expansão clonal de uma célula tronco hematopoética pluripotente que apresenta uma alteração citogenética denominada cromossomo Philadelphia (figura 5), que é resultante da translocação entre os cromossomos 9 e 22. O resultado desta translocação cromossômica é a expressão de uma proteína, produto do gene quimérico *bcr-abl*, denominada também BCR-ABL, (BARBOZA et al., 2000). Esta proteína tem alta atividade de tirosina-quinase e representa o evento central na patogênese da LMC. A enzima BCR-ABL é a responsável pela transformação da célula hematopoética normal em maligna, que apresentará intensa proliferação e resistência a morte celular induzida por quimioterápicos clássicos (KUJAWSKI; TALPAZ, 2007).

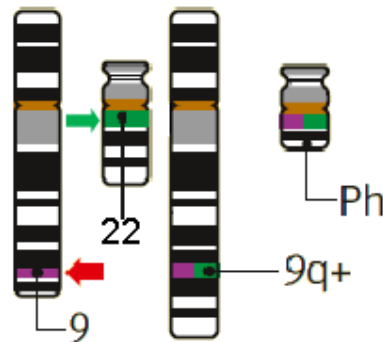


Figura 5. Translocação t(9;22). Cromossomos 9 e 22 normais, os quais na LMC são substituídos por um cromossomo 22 encurtado (denominado 22q- ou Philadelphia) e um cromossomo 9 alongado (denominado 9q+). As setas indicam as posições dos genes normais ABL1 (vermelha) e BCR (verde). Fonte: GOLDMAN, J.M., 2009.

A fase crônica inicial desta doença tem duração média de 3 a 4 anos e é caracterizada por uma expansão massiva da linhagem celular granulocítica, embora a maioria, senão todas as linhagens hematopoiéticas possam ser produzidas a partir da célula tronco na LMC (REN, 2005).

A aquisição de anormalidades genéticas e/ou epigenéticas adicionais causa a progressão da LMC da fase crônica para as fases acelerada e blástica. Esta última fase é caracterizada por um bloqueio da diferenciação celular o que resulta na presença de 30% ou mais de células blásticas linfóides ou mielóides no sangue periférico ou na medula óssea, ou a presença de infiltrados de células blásticas extramedulares (REN, 2005). A crise blástica é altamente resistente ao tratamento, levando a morte dos pacientes por infecções e sangramentos, que são complicações resultantes da ausência de granulócitos normais e plaquetas em circulação (RADICH et al., 2006).

A LMC foi a primeira neoplasia associada a uma aberração cromossomal (o cromossomo Philadelphia) cuja elucidação da patogênese molecular conduziu ao desenvolvimento de uma terapia alvo-molecular (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

O conhecimento da fisiopatologia, o diagnóstico direto, o prognóstico bem estabelecido e os tratamentos para a causa desta doença, fazem com que a LMC seja estudada numa extensão que supera o esperado pela sua incidência, e sirva como doença modelo para outros tipos de câncer (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

As abordagens terapêuticas empregadas no tratamento da LMC são o transplante alogênico de medula óssea, o interferon-alfa e os inibidores seletivos da BCR-ABL tirosina-quinase (mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe) (GOLDMAN, 2009; HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007)

O transplante alogênico de medula óssea é a única terapia curativa para a LMC, mas a idade do paciente e a disponibilidade de doadores limitam esta opção a uma minoria dos doentes (O'DWYER; DRUKER, 2000). Além disso, o procedimento apresenta diversas desvantagens como complicações clínicas, efeitos adversos, mortalidade precoce ou tardia ligada ao procedimento, a doença do enxerto-*versus*-hospedeiro aguda e crônica, a imunossupressão prolongada, o risco de neoplasias tardias, a esterilidade, o retardo do crescimento entre outras (SOUZA; PAGNANO, 2004).

A terapia com interferon-alfa recombinante era a abordagem padrão no tratamento da fase crônica da LMC até a descoberta do mesilato de imatinibe (HEHLMANN et al., 2007). Estudos randomizados comparativos entre o imatinibe e

interferon-alfa demonstraram que aquele proporcionou melhores taxas de remissão (hematológica, citogenética e molecular) da doença e menos efeitos adversos (O'BRIEN et al., 2003). Os efeitos adversos apesar de não constituírem ameaça à vida dos pacientes, reduzem sua qualidade de vida e são as principais desvantagens da terapia com interferon-alfa (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

O tratamento de escolha para os pacientes que se apresentam na fase crônica da LMC é o inibidor da tirosina-quinase, mesilato de imatinibe (BACCARANI et al., 2006). Este agente é capaz de controlar os sinais clínicos e as alterações hematológicas da LMC em mais de 95% dos pacientes e pode induzir a remissão citogenética em 70-80% dos pacientes não tratados previamente. Para os 70% dos pacientes que alcançam resposta citogenética completa, o imatinibe prolonga a sobrevida se comparado as demais abordagens terapêuticas, apesar de estar em uso por pouco mais de dez anos e a extensão de seus benefícios não estarem ainda totalmente claras (GOLDMAN, 2009).

1.3. MESILATO DE IMATINIBE

Em 1998 o mesilato de imatinibe (STI571, CGP 57148B, Glivec®), um inibidor da enzima tirosina-quinase, foi introduzido a lista de fármacos empregados na terapia para a LMC revolucionando seu tratamento e substituindo a terapia com interferon-alfa (até então tratamento de frente para LMC) nos pacientes não elegíveis para o transplante alogênico de medula óssea (MELO; CHUAH, 2007).

O mesilato de imatinibe é um exemplo que ilustra a efetividade do desenvolvimento clínico direcionado de fármacos baseado no conhecimento dos eventos patogênicos moleculares de uma doença (DRUKER, 2002).

O mesilato de imatinibe, 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-(4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil)benzamida metanossulfonate (figura 6) atua bloqueando o sítio de ligação do ATP na BCR-ABL tirosina-quinase impedindo que seu substrato seja fosforilado (figura 7) e conseqüentemente inibindo sua atividade enzimática (O'DWYER; DRUKER, 2000). Sendo assim, o fármaco inibe

seletivamente a proliferação e induz a apoptose nas linhagens celulares BCR-ABL positivas sem afetar em grande escala as células normais (DRUKER et al., 2001).

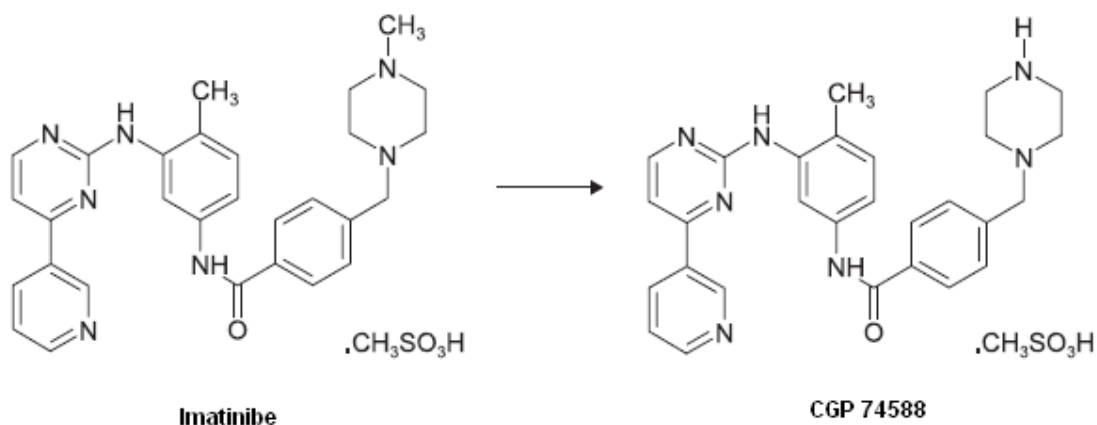


Figura 6. Estrutura química do mesilato de imatinibe e seu principal metabólito (CGP 74588). Fonte: OOSTENDORP et al., 2007.

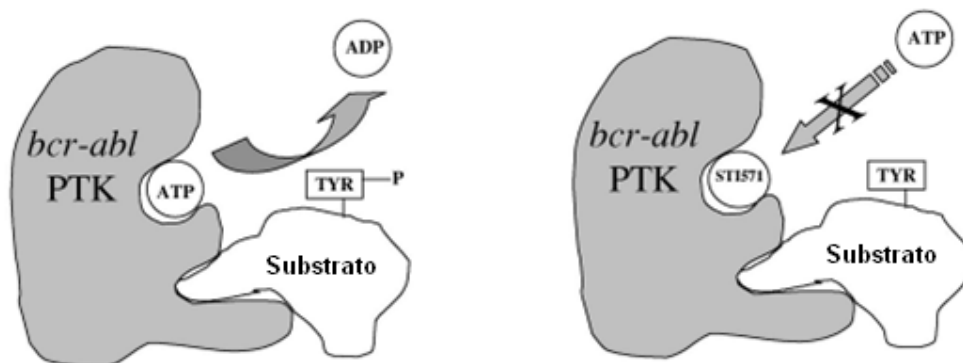


Figura 7. Mecanismo de ação. O imatinibe bloqueia o sítio de ligação do ATP na oncoproteína bcr-abl tirosina quinase, impedindo sua atividade enzimática. Fonte: BAHKTIAR et al., 2002.

A dosagem de Glivec® recomendada para pacientes com LMC na fase crônica é de 400 mg/dia e de 600 a 800 mg/dia para pacientes em fase acelerada ou em crise blástica (DRUKER et al., 2001).

Quanto à farmacocinética, o mesilato de imatinibe é absorvido após administração oral e atinge concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas

(PENG et al., 2004). A biodisponibilidade absoluta média para o imatinibe administrado por via oral, independentemente da forma farmacêutica (solução, cápsula, comprimido) ou da dosagem é de 98% (PENG; LLOYD; SCHRAN, 2005).

Após administração oral em voluntários sadios, as meias-vidas de eliminação do imatinibe e de seu principal metabólito ativo (figura 6), o derivado piperazínico n-desmetilado (CGP-74588), são de 18 e 40 horas, respectivamente (CHABNER et al., 2007). A área sob a curva média aumenta proporcionalmente com o aumento da dose na faixa de 25 a 1000 mg (PENG et al., 2004). Não é observada nenhuma mudança significativa na farmacocinética com doses repetidas ou com a administração do fármaco com alimentos (CHABNER et al., 2007).

Com base na recuperação dos compostos após uma dose oral de mesilato de imatinibe marcado com ^{14}C , aproximadamente 81% da dose foi eliminada pelas fezes (68% da dose) e pela urina (13% da dose) no período de 7 dias. O imatinibe inalterado respondeu por 25% da dose (5% na urina, 20% nas fezes), sendo o restante, representado pelos metabólitos (GSCHWIND et al., 2005).

Quanto às propriedades físico-químicas, sua fórmula molecular é $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}\cdot\text{CH}_4\text{SO}_3$ e seu peso molecular é 589,7. O mesilato de imatinibe é uma base quadrivalente com valores de constante de dissociação ácida (pKa) variando entre 1,52 e 8,07. É livremente solúvel em água em pH 5,5 ou menor e sua solubilidade em tampão aquoso diminui com o aumento do pH. O fármaco é pouco solúvel em pH fisiológico (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em pH 7,4 com logP 1,99) e quase insolúvel em pH 8,0. O mesilato de imatinibe é solúvel em solventes polares orgânicos tais como metanol e etanol, mas é muito pouco solúvel ou insolúvel em solventes orgânicos de baixa polaridade. É estável em fluido gástrico artificial (1 hora em pH 1,2 à 37 °C) não mostrando hidrólise da ligação amida nestas condições (PENG; LLOYD; SCHRAN, 2005).

Logo após a introdução deste fármaco na prática clínica, foi evidenciada a existência de pacientes resistentes ou refratários ao tratamento com mesilato de imatinibe (APPERLEY, 2007). Diversos mecanismos de resistência foram descritos dentre os quais o mais freqüente é o aparecimento de mutações pontuais no domínio quinase da enzima BCR-ABL. Estas mutações causam a substituição de aminoácidos dentro do domínio quinase da proteína BCR-ABL, prejudicando a ligação do imatinibe e resultando na perda da sensibilidade ao fármaco (VOLPE et

al., 2009). Entretanto, a resistência a qualquer fármaco é provavelmente um processo multifatorial (APPERLEY, 2007).

Diferentemente dos quimioterápicos utilizados em neoplasias que normalmente são administrados em curtos ciclos por via intravenosa, o imatinibe é administrado oralmente por períodos prolongados senão continuamente, e como qualquer outra medicação oral está sujeita a variações na absorção gastrointestinal e no metabolismo de primeira passagem, bem como no influxo e efluxo celular do fármaco e inativação enzimática (APPERLEY, 2007).

Os citocromos P450 3A4 e P450 3A5 (CYP3A4 e CYP3A5) são as principais isoformas responsáveis pelo metabolismo do mesilato de imatinibe (COHEN et al., 2002; DEININGER; DRUKER, 2003). Como é sabido, a atividade enzimática do CYP 3A4 apresenta grande variabilidade interindividual e é suscetível a indução ou inibição por diversas co-medicações, constituintes ambientais e dietéticos (WIDMER et al., 2004). Portanto, interações podem ocorrer entre o imatinibe e indutores ou inibidores destas enzimas levando a alterações nas concentrações plasmáticas do imatinibe bem como na de fármacos co-administrados (PENG; LLOYD; SHCRAN, 2005). Além disso, como o imatinibe se liga extensivamente às proteínas plasmáticas, cerca de 95%, principalmente a albumina e a alfa-glicoproteína ácida (PENG; LLOYD; SCHRAN, 2005), somente uma pequena fração livre tem a possibilidade de entrar nas células e exercer seu efeito farmacológico.

Assim todos estes fatores fazem do imatinibe um bom candidato ao monitoramento terapêutico, já que uma dose do imatinibe pode resultar em concentrações plasmáticas bastante diferentes entre pacientes, favorecendo a seleção de clones celulares resistentes no caso de uma exposição sub-terapêutica, ou aumentando o risco de reações adversas devido a níveis plasmáticos excessivos (HAOUALA, 2009).

1.3.1. Análise do mesilato de imatinibe

Na literatura existem diversos trabalhos referentes à análise do mesilato de imatinibe em matrizes biológicas (tabela 1).

Tabela 1 – Métodos para análise do imatinibe em material biológico encontrados na literatura

Referência	Analitos	Técnica/ Detecção	Matriz	Extração
BAHKTAR et al., 2002a	imatinibe e CGP 74588	LC/MS	plasma humano	precipitação de proteínas semi-automático
BAHKTAR et al., 2002b	imatinibe e CGP 74588	LC/MS	plasma de macaco	extração em fase sólida
PARISE et al., 2003	imatinibe e CGP 74588	LC/MS	plasma humano	precipitação de proteínas
GUETENS et al., 2003	imatinibe	LC/MS	plasma e eritrócitos	precipitação de proteínas
WIDMER et al., 2004	imatinibe	HPLC/UV	plasma humano	extração em fase sólida
VELPANDIAN et al., 2004	imatinibe	HPLC/UV	plasma humano	precipitação de proteínas
SCHLEYER et al., 2004	imatinibe e CGP 74588	HLPC/UV	plasma, urina, fluido cerebroespinal, meio de cultura e preparações celulares	precipitação de proteínas
TITIER et al., 2005	imatinibe	LC/MS-MS	plasma humano	extração líquido-líquido
OOSTENDORP et al., 2007	imatinibe e CGP 74588	HPLC/UV	plasma humano e matrizes biológicas de camundongos	extração líquido-líquido
BODDY et al., 2007	imatinibe	LC/AMS LC/MS	plasma humano	precipitação de proteínas
GUETENS et al., 2007	Imatinibe e AMN107	HPLC/UV	cultura de células tumorais	extração líquido-líquido
DE FRANCIA et al., 2009	imatinibe, dasatinibe, nilotinibe	HPLC/MS	plasma humano	precipitação de proteínas
HAOUALA et al., 2009	imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, sunitinibe, sorafenibe, lapatinibe	LC/MS-MS	plasma humano	precipitação de proteínas
AWIDI et al., 2010	imatinibe	HPLC/UV LC/MS-MS	plasma humano	precipitação de proteínas Extração líquido-líquido
ROTH et al., 2010	imatinibe	HPLC/UV	plasma humano	precipitação de proteínas
DAVIES et al., 2010	Imatinibe, GGP 74588, nilotinibe	HPLC/UV	plasma humano	extração em fase sólida

Além dos trabalhos acima descritos outros foram publicados referentes à análise do imatinibe, suas impurezas e produtos de degradação em formas

farmacêuticas e matéria-prima. Vivekanand et al. (2003) desenvolveram um método por HPLC e detecção UV para análise do mesilato de imatinibe e intermediários de síntese ou impurezas em matéria-prima. Os autores mostraram a presença de baixas porcentagens de impureza, denominadas I, II e III e uma impureza desconhecida. Para análise do fármaco e de suas impurezas em produto acabado, Ivanovic et al. (2004), Medenica et al. (2004) e Rosasco et al. (2005) utilizaram HPLC com detecção UV. Os autores concluíram que o método é apropriado para análise qualitativa e quantitativa em formas farmacêuticas, que não há interferência dos excipientes na análise e que o valor encontrado do ativo está de acordo com a quantidade declarada.

Vadera, Subramanian e Musmade (2007) utilizando a cromatografia em camada delgada de alta eficiência desenvolveram um método específico, exato e preciso para determinação do mesilato de imatinibe em matéria-prima e produto acabado na presença de seus produtos de degradação. Este método também pode ser utilizado para estudos de cinética de degradação. Szczepek et al. (2007) avaliaram a estabilidade do mesilato de imatinibe sob condições de *stress* e concluíram que o fármaco é fotoestável e estável em meio neutro. Em condições ácidas, alcalinas e de oxidação foram obtidos alguns produtos de degradação.

Como pode ser observado, até o momento desta revisão bibliográfica, a grande maioria dos métodos disponíveis emprega a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica analítica. Apenas dois trabalhos foram encontrados na literatura utilizando a eletroforese capilar. Rodríguez-Flores et al. (2005) e Rodríguez-Flores et al. (2003) empregaram a eletroforese capilar em meio não aquoso e a eletroforese capilar de zona, respectivamente, para análise do imatinibe e de seu principal metabólito em urina. Os métodos foram validados e os valores obtidos de linearidade, precisão, exatidão e robustez foram adequados para aplicação em estudos clínicos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um método para quantificação do mesilato de imatinibe, fármaco utilizado no tratamento da Leucemia Mielóide Crônica, em plasma empregando a técnica de eletroforese capilar.

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar as condições para a análise do mesilato de imatinibe por eletroforese capilar;
- Desenvolver e validar um método para sua análise em plasma utilizando a extração líquido-líquido;
- Aplicar o método desenvolvido e validado na análise de amostras de plasma de pacientes diagnosticados com LMC em tratamento com o mesilato de imatinibe.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE DO IMATINIBE POR CE

3.1.1. Padrão, reagentes e solventes

O tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5 foi adquirido da Agilent (New Castle, EUA) e utilizado como eletrólito de corrida.

O metanol utilizado na preparação das soluções padrão do fármaco para eletroforese capilar e para a determinação do espectro de absorção foi grau cromatográfico obtido da Fisher Scientific (Fair Lawn, EUA).

O padrão de mesilato de imatinibe foi gentilmente cedido pela Novartis (Basel, Suíça).

3.1.2. Capilar

O capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno, revestido externamente por uma camada de polimida foi obtido da empresa Microsolv (Eatontown, EUA). Este foi dimensionado em 64,5 cm de comprimento total e 56 cm de comprimento efetivo (distância entre a extremidade de injeção da amostra e a janela de detecção) com o auxílio de uma lâmina específica para o corte obtida da Agilent (Waldbroom, Alemanha), que permite um corte homogêneo sem danificar as extremidades. A janela óptica de detecção de aproximadamente 0,5 cm de comprimento foi obtida pela remoção do revestimento de polimida a 8,5 cm de uma das extremidades do capilar, através da aplicação de calor. A polimida queimada foi removida com o auxílio de um algodão embebido em acetona. A remoção da camada de polimida é necessária para permitir a detecção óptica no capilar.

3.1.3. Equipamentos

As análises eletroforéticas foram realizadas em um aparelho de eletroforese capilar da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), composto por um analisador modelo G1600A e um detector de arranjo de diodos. As injeções foram realizadas por um amostrador automático. O equipamento foi controlado pelo *software* Chemstation 3D-CE, versão A.08.03, que foi também usado na aquisição e tratamento dos dados.

Espectrofotômetro UV-Vis da marca Femto (São Paulo, Brasil), modelo 800XI, controlado por computador, foi utilizado para a obtenção do espectro de absorção do mesilato de imatinibe.

Os componentes empregados no preparo dos eletrólitos foram pesados em balança analítica Ohaus, modelo Adventurer (Pine Brook, EUA) e o padrão do mesilato de imatinibe foi pesado em balança analítica Shimadzu Modelo AUW220D (Kyoto, Japão). Para degaseificação e dissolução dos solutos utilizados na análise eletroforética foi empregado um aparelho de ultra-som da marca Thorton Unique, modelo USC1450 (Santo André, Brasil). Foi utilizado também um agitador Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, Brasil) na preparação das amostras.

Um sistema de purificação de água, Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA) forneceu água livre de resíduos orgânicos e inorgânicos para preparação dos eletrólitos de corrida e para lavagem do capilar.

3.1.4. Determinação do espectro de absorção do mesilato de imatinibe

A amostra para obtenção do espectro de absorção do mesilato de imatinibe foi preparada transferindo-se 500 μL da solução padrão de concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ para balão de 10 mL e completando-se o volume com metanol. O espectrofotômetro foi designado para operar no modo de varredura. Antes da varredura espectral da amostra, preparada em metanol como descrito acima, efetuou-se a correção da linha de base preenchendo-se uma cubeta de cristal de quartzo com este solvente, ou

seja, o branco da amostra. Logo após, a cubeta foi lavada e preenchida com a solução do fármaco e submetida à varredura no intervalo de comprimento de onda correspondente a região do ultravioleta.

3.1.5. Análise do mesilato de imatinibe por CE

Foi preparada uma solução mãe de imatinibe pesando-se uma massa do fármaco correspondente a 5,0 mg (base livre), seguida da diluição em balão volumétrico de 5 mL com metanol, obtendo-se uma solução de concentração 1 mg/mL. A partir desta solução estoque foram preparadas soluções de trabalho também em metanol nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100, e 200 µg/mL. As soluções foram armazenadas em tubos de vidro, protegidas da luz, sob refrigeração a 4 °C.

No preparo das amostras para condução dos estudos em eletroforese capilar, 25 µL da solução-padrão do fármaco foram transferidos para um tubo, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi reconstituído em 50 µL de solução metanol/água (30:70 v/v) com o auxílio de um *mixer*.

3.2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO IMATINIBE EM PLASMA

3.2.1. Padrão, reagentes e solventes

O tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5 foi adquirido da Agilent (New Castle, EUA) e utilizado como eletrólito de corrida.

O metanol utilizado na preparação das soluções padrão do fármaco foi grau cromatográfico obtido da Fisher Scientific (Fair Lawn, EUA). No preparo das amostras e na lavagem do capilar foi utilizada água ultrapura fornecida por um

sistema de purificação Milli-Q plus Millipore/Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA).

O mesilato de imatinibe (Novartis, Basel, Suíça) e os analitos testados como padrão interno (PI), fluoxetina, oxibutinina, diazepam, amitriptilina, acetaminofeno, propranolol e cloridrato de lidocaína (Sigma, St. Louis, EUA) foram preparadas em metanol grau cromatográfico obtido da Fisher Scientific (Fair Lawn, EUA).

Os solventes orgânicos, grau cromatográfico, testados na extração foram hexano, éter etílico, éter diisopropílico, acetato de etila, tolueno, clorofórmio e diclorometano obtidos da Mallinckrodt (Paris, França) e o éter metil-*terc*-butílico (do inglês, *methyl-tert-butyl-ether*, MTBE) da Tedia (Fairfield, EUA).

3.2.2. Soluções-padrão

Para análise do mesilato de imatinibe foi preparada uma solução estoque, em metanol, na concentração de 1,0 mg/mL (base livre). A partir desta solução estoque foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100, e 200 µg/mL em metanol. Todas as soluções foram estocadas em tubo de vidro âmbar sob refrigeração a 4 °C.

3.2.3. Capilar

Foi utilizado o capilar de sílica fundida da marca Agilent (Waldbroom, Alemanha) com dimensões de 46,5 cm de comprimento total, 38 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno.

3.2.4. Plasma

O presente projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP e o ofício de aprovação do protocolo de pesquisa encontra-se anexado ao final (Anexo A).

As amostras de plasma humano foram cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Os plasmas foram centrifugados por 20 minutos (1800 *g*) e congelados em alíquotas para uso posterior.

3.2.5. Equipamentos

Os equipamentos utilizados na análise do mesilato de imatinibe em plasma foram o sistema eletroforético e os demais equipamentos descritos no item 3.1.3, acrescentando-se ainda uma centrífuga Fanem Excelsa Baby I modelo 206 (Guarulhos, São Paulo).

3.2.6. Procedimento de preparo da amostra

O procedimento de preparação de amostra foi baseado na extração líquido-líquido que tem como princípio a partição do soluto entre duas fases imiscíveis: uma fase aquosa e outra orgânica.

Em tubos de extração foram transferidos 25 μL de solução padrão do fármaco, 25 μL do padrão interno (PI) e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma branco (sem o fármaco) previamente centrifugado e os tubos foram agitados por 30 segundos em *mixer*, em seguida foram adicionados 200 μL de NaOH 1 mol/L, 4 mL de solvente orgânico e os tubos foram novamente agitados por 2 minutos em *mixer*.

Após este tempo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos (1800 g), a fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi recolhida em tubos cônicos de vidro. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e o resíduo reconstituído em 50 μ L de solução metanol/água (30:70) e analisado por CE (figura 8).

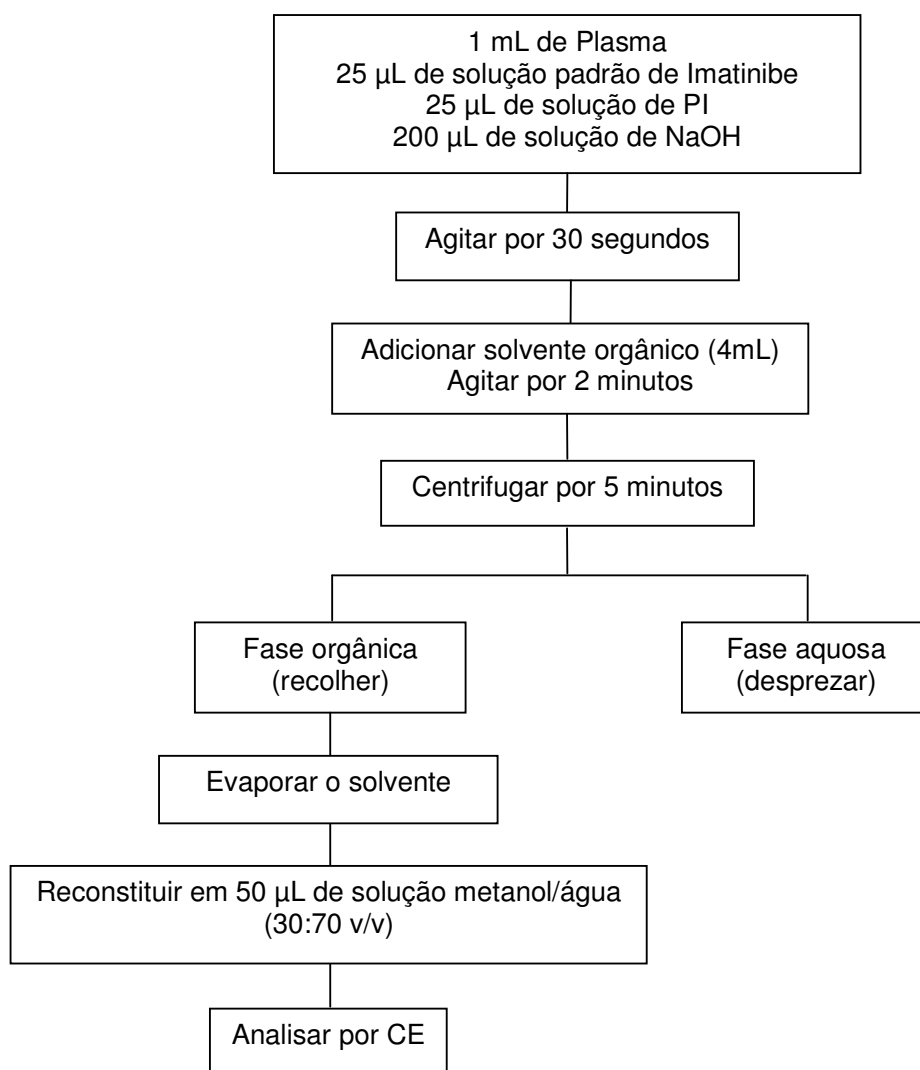


Figura 8. Procedimento de preparo das amostras de plasma para análise do imatinibe por CE.

3.2.7. Seleção do solvente de extração

Em tubos de extração foram transferidos 25 µL de solução padrão do fármaco e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma branco previamente centrifugado e os tubos foram agitados por 30 segundos em *mixer*, em seguida foram adicionados 200 µL de NaOH 1mol/L e 4 mL do solvente orgânico a ser testado. Após isto o procedimento de extração seguiu como descrito na figura 8. Este procedimento foi realizado em duplicata.

Os solventes testados foram o éter etílico, o éter diisopropílico, o hexano, o acetato de etila, o clorofórmio, o diclorometano, o tolueno e o éter metil-terc-butílico (MTBE) individualmente ou em misturas. Também foram feitos os brancos das amostras para cada um destes solventes, ou seja, foi feita a extração do plasma sem a adição do fármaco.

3.2.8. Seleção do PI

Em tubo de extração foram transferidos 25 µL de solução padrão do fármaco, 25 µL da solução de PI a ser testada e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma branco previamente centrifugado e os tubos foram agitados por 30 segundos em *mixer*, em seguida foram adicionados 200 µL de NaOH 1mol/L, 4 mL do solvente extrator e os tubos foram novamente agitados por 2 minutos em *mixer*. Após isto o procedimento de extração seguiu como descrito na figura 8.

As soluções testadas como PI foram: cimetidina 10 µg/mL, fluoxetina 80 µg/mL, oxibutinina 400 µg/mL, diazepam 1 mg/mL, amitriptilina 1 mg/mL, cloridrato de lidocaína 50 µg/mL, acetaminofeno 1 mg/mL e propranolol 1mg/mL.

3.3. VALIDAÇÃO

O protocolo de validação do método baseou-se na resolução 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

3.3.1. Calibração e Linearidade

Em tubos de extração foram transferidos 25 μ L das soluções-padrão do fármaco, 25 μ L da solução do PI e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma branco e os tubos foram agitados em *mixer* por 30 segundos. Estas amostras de plasma enriquecidas, preparadas em triplicata para cada nível de concentração, foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8 e analisadas por CE.

O gráfico de calibração foi construído plotando-se no eixo das abscissas a concentração plasmática do fármaco 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 2,50 e 5,00 μ g/mL e no eixo das ordenadas a razão entre a área do fármaco e a área do PI.

A linearidade do método foi avaliada como descrito acima, porém contemplou as concentrações plasmáticas de 0,125, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 2,50 e 5,00 μ g/mL.

3.3.2. Limite de Quantificação (LQ)

O LQ foi estabelecido através da análise de 5 amostras de plasma branco enriquecidas com solução-padrão do fármaco na concentração plasmática de 0,125 μ g/mL e submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8.

3.3.3. Recuperação

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração foi realizada a análise do fármaco nas concentrações plasmáticas especificadas abaixo, omitindo-se a etapa de extração. Em tubos cônicos de vidro foram transferidos 25 µL das soluções-padrão do fármaco contemplando as concentrações baixa, média e alta da faixa de linearidade do método (0,50, 2,00 e 5,00 µg/mL) e 25 µL da solução de PI. O solvente foi evaporado até a secura sob fluxo de ar comprimido, o resíduo foi reconstituído em 50 µL de solução metanol/água (30:70) e analisado por CE.

Amostras de plasma (n=5) enriquecidas com solução-padrão do fármaco e PI, nas mesmas concentrações descritas acima, foram preparadas segundo o procedimento de extração descrito na figura 8. O resíduo foi reconstituído em 50 µL de solução metanol/água (30:70) e analisado por CE.

A recuperação do fármaco e do padrão interno foi calculada comparando-se os resultados obtidos das soluções-padrão não extraídas com as amostras de plasma enriquecidas que passaram pelo procedimento de extração, de acordo com seguinte fórmula (CAUSON, 1997):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{resposta do analito na matriz (amostra processada)} \times 100}{\text{resposta do analito no padrão (não processado)}}$$

3.3.4. Precisão e Exatidão

Para avaliar a precisão e exatidão inter e intraensaio foi feito um gráfico de calibração, no intervalo de concentração plasmática de 0,25 a 5,00 µg/mL em duplicata, conforme procedimento de extração descrito na figura 8. Para o estudo da precisão e exatidão foram preparadas amostras de plasma branco enriquecidas com 25 µL das soluções-padrão do fármaco, contemplando as concentrações baixa, média e alta do intervalo linear do método (0,50, 2,00 e 5,00 µg/mL), e estas

submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8. As amostras foram preparadas em sextuplicata para cada nível de concentração.

A precisão e a exatidão interensaio foram avaliadas durante três dias consecutivos e a precisão e exatidão intraensaio foram avaliadas no mesmo dia.

Os cálculos para avaliar a precisão do método foram feitos usando-se o gráfico de calibração e as dispersões em relação aos valores médios foram expressas como coeficiente de variação (CV):

$$CV\% = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{média}}$$

A exatidão foi expressa como a porcentagem de erro em relação a concentração teórica e calculada segundo a fórmula (CAUSON, 1997):

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(\text{concentração média experimental} - \text{concentração teórica}) \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

3.3.5. Estabilidade

3.3.5.1. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Amostras de plasma branco enriquecidas com 25 µL de solução-padrão do fármaco nas concentrações baixa e alta da curva de calibração (0,50 e 5,00 µg/mL) foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento da seguinte maneira: foram congeladas à temperatura de -20 °C e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por 24 horas e assim sucessivamente até completarem os três ciclos. As amostras foram preparadas em sextuplicata para cada concentração.

Após os ciclos as amostras foram enriquecidas com o PI e passaram pelo procedimento de extração (descrito na figura 8) e os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos em amostras recém-preparadas e extraídas.

3.3.5.2. Estabilidade de curta duração

As amostras de plasma branco enriquecidas com 25 µL do fármaco nas concentrações de 0,50 e 5,00 µg/mL, preparadas em sextuplicata, foram mantidas a temperatura ambiente por um período de 12 horas. Após este tempo as amostras foram acrescidas da solução do PI e submetidas ao procedimento de extração (figura 8). Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de amostras recém-preparadas e extraídas.

3.3.5.3. Estabilidade de longa duração

O estudo de estabilidade de longa duração foi feito para um período de sete dias.

Amostras de plasma branco, preparadas em sextuplicata, enriquecidas com 25 µL de solução-padrão do fármaco nas concentrações baixa e alta da curva de calibração (0,50 e 5,00 µg/mL) foram mantidas congeladas à -20 °C. Após uma semana estas amostras foram descongeladas à temperatura ambiente, acrescidas da solução do PI e submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles de amostras recém preparadas e extraídas.

Os dados obtidos nos estudos de estabilidade foram analisados estatisticamente pelo teste de análise de variância (ANOVA).

3.3.6. Seletividade

Para verificação da seletividade foram submetidas ao procedimento de extração amostras de plasma enriquecidas com fármaco e PI e amostras isentas destes (brancos). Plasmas de diferentes lotes foram misturados para se obter um *pool* de amostras.

Em tubos de extração foram adicionados 25 µL de solução-padrão do fármaco, 25 µL de solução de PI e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma branco e os tubos foram agitados em *mixer* por 30 segundos. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 8 e analisadas por CE. O mesmo procedimento foi feito para as amostras de plasma branco omitindo-se a etapa de adição da solução-padrão de imatinibe e PI.

3.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO E VALIDADO

O método para quantificação do imatinibe após desenvolvido e validado, foi aplicado na análise de plasma de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica em tratamento com Glivec, há pelo menos 1 mês, na dose diária de 400 mg.

O plasma foi mantido congelado a -20 °C e descongelado à temperatura ambiente no momento da análise.

Em tubo de extração foram transferidos 25 µL da solução de padrão interno e o solvente foi evaporado à secura sob fluxo de ar comprimido. Foi adicionado 1 mL de plasma de paciente e o tubo foi agitado por 30 segundos em *mixer*, em seguida foram adicionados 200 µL de NaOH 1mol/L, 4 mL do solvente orgânico MTBE e o tubo foi novamente agitado por 2 minutos em *mixer*.

Após este tempo, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 1800 *g*. A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi recolhida em tubos de vidro de fundo cônico. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido, o resíduo reconstituído em 50 µL de solução metanol/água (30:70) e analisado por CE.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SELEÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE DO IMATINIBE POR CE

4.1.1. Espectrofotometria de absorção do mesilato de imatinibe

A seleção do comprimento de onda adequado para a detecção é importante na obtenção de bons resultados analíticos.

Para iniciar os estudos foi verificado o comprimento de onda em que o composto apresentava maior absorbância, para isto foi preparada uma solução do fármaco em metanol e realizada a varredura espectral na região do ultravioleta (figura 9).

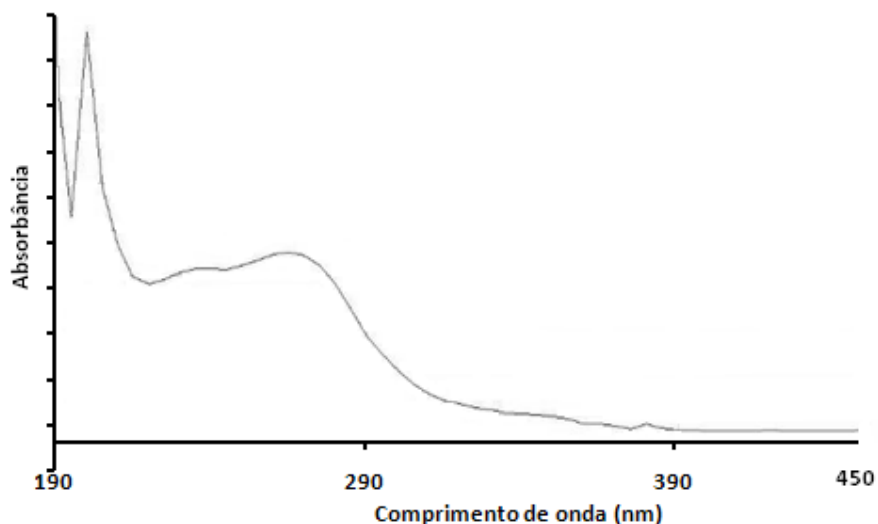


Figura 9. Espectro de absorção do mesilato de imatinibe em metanol na região do ultravioleta.

O espectro de absorção do fármaco apresentou duas regiões de absorção máxima: uma em 200 nm e outra entre 250 e 270 nm.

Muitos solutos possuem atividade UV aumentada em baixos comprimentos de onda. A detecção nestas condições poderia ser problemática, por exemplo, nas

análises por cromatografia líquida de alta eficiência, onde alguns solventes orgânicos apresentam excessiva absorvância UV de *background*. No caso da CE, entretanto, onde são empregados eletrólitos basicamente aquosos, esta absorvância de *background* não é excessiva, o que possibilita trabalhar em baixos comprimentos de onda (ALTRIA, 1996). Sendo assim, o fármaco foi monitorado no comprimento de onda de 200 nm.

4.1.2. Seleção do eletrólito de corrida

O eletrólito de corrida tem um papel central em CE. O pH, o tipo, a concentração e a força iônica influenciam muitos aspectos em uma análise, como a velocidade de migração do soluto, a separação, a eficiência e a forma do pico (JANINI; ISSAQ, 1993).

Em CE, o pH do eletrólito de corrida tem impacto significativo na ionização dos grupos silanóis acídicos da parede do capilar e conseqüentemente no potencial zeta influenciando o fluxo eletrosmótico. Além disso, o pH também tem impacto na ionização dos compostos em análise influenciando a sua mobilidade eletroforética. Sendo assim, é importante manter constante o valor do pH do eletrólito, ou seja, é importante que o eletrólito de corrida tenha alta capacidade tamponante.

Outras características desejáveis para uma solução tampão incluem: baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise, e baixa mobilidade para minimizar a geração de calor por efeito Joule (TAVARES, 1997).

O mesilato de imatinibe é uma base quadrivalente com constantes de ionização ácida (pKa) variando entre 1,52 e 8,07 (1,52; 2,56; 3,73; 8,07). Em pHs menores do que 8,07 o fármaco se encontra na forma ionizada, ou seja, positivamente carregado e a relação carga/massa aumenta com a diminuição do pH do meio.

Sendo assim, optou-se por trabalhar com o tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5. Neste pH o EOF é negligenciável mas o fármaco apresenta maior relação carga/massa.

4.1.3. Capilar

Em CE o capilar é o coração do sistema já que é nele que acontece a separação propriamente dita.

Os estudos foram inicialmente conduzidos em um capilar da marca Microsolv cujas dimensões e janela de detecção foram confeccionadas manualmente segundo o procedimento descrito no item 3.1.2. (Capilar).

As dimensões do capilar escolhidas inicialmente para análise do mesilato de imatinibe foram: 64,5 cm de comprimento total; 56 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno.

A escolha das dimensões do capilar é importante no desenvolvimento do método, pois tem efeito sobre diversos fatores como tempo de migração, resolução, sensibilidade na detecção, dissipação do calor e adsorção (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993).

Em relação ao comprimento, quanto maior a distância entre a extremidade de injeção e o detector, maior o tempo de migração do composto. Portanto um aumento no tamanho do capilar aumenta o tempo de migração. Além disso, o aumento do tamanho do capilar também contribui para um aumento na resolução dos compostos em análise (ALTRIA, 1996).

Durante a análise por eletroforese capilar, a energia elétrica é parcialmente convertida em calor (efeito Joule). Se o calor gerado não é adequadamente dissipado, ocorre a formação de gradientes de temperatura, que induzem gradientes de densidade, que por sua vez podem causar correntes de convecção no interior do capilar (TAVARES, 1996). Esse calor gerado pode ter impacto sobre a análise levando a variações no tempo de migração dos analitos e uma diminuição na resolução e eficiência dos picos. O diâmetro interno do capilar utilizado foi de 50 μm , uma vez que capilares de diâmetros internos menores apresentam uma maior habilidade para dissipar calor, por possuírem maior razão superfície/volume (MAYER, 2001).

Outro fator importante relacionado ao capilar em CE é seu condicionamento. Os capilares foram submetidos a este tratamento antes do primeiro uso, no início e fim das atividades do dia e entre as análises (pré-condicionamento).

Antes do primeiro uso os capilares novos foram condicionados com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L durante 60 minutos e lavados em seguida com água ultra-pura pelo mesmo tempo.

Durante o processo de fabricação os capilares de sílica fundida são submetidos a altas temperaturas e a superfície de suas paredes sofre completa desidroxilação. Durante a armazenagem, na presença do ar atmosférico, esta superfície volta a se reidroxilar num grau variável, dependente da umidade do ar (GOMEZ; SANDOVAL, 2008). O condicionamento dos capilares novos, normalmente feito com solução de NaOH 1 mol/L, restaura os grupos silanóis da parede interna produzindo uma superfície homogênea e reduzindo assim variações entre capilares de sílica de diferentes lotes ou fabricantes (MAYER, 2001).

O pré-condicionamento da superfície interna do capilar é importante para a eficiência da separação bem como para a repetibilidade corrida a corrida, já que as propriedades desta superfície (potencial zeta) são responsáveis pela geração do EOF e sua velocidade. Este procedimento faz com que o capilar retorne as condições iniciais da análise levando à redução na variação dos tempos de migração por reduzir a influência da variação do EOF (ALTRIA, 1996; MAYER, 2001).

O pré-condicionamento foi estabelecido da seguinte maneira: lavagem com uma solução diluída de NaOH (0,1 mol/L) por 3 minutos, seguida da lavagem com água por 3 minutos e finalmente com o eletrólito de corrida por 4 minutos. Esta lavagem mais rigorosa, por um tempo mais extenso, foi realizada devido à complexidade da matriz biológica que seria utilizada posteriormente no estudo.

A lavagem com solução de hidróxido de sódio restaura os grupos silanóis da parede do capilar e também reduz possíveis “efeitos de memória”, causados pela adsorção do fármaco ou de componentes do tampão na parede do capilar (FALLER; ENGELHARDT, 1999), a lavagem com água remove a solução anterior e o eletrólito de corrida equilibra a sílica às condições da análise.

No início e também ao final das atividades do dia, o capilar foi lavado com solução de NaOH 1 mol/L por 15 minutos e com água pelo mesmo tempo.

Assim, em relação ao capilar, as condições adotadas foram:

- Dimensões: 64,5 cm de comprimento total, 56 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno.

- Condicionamento para o início das análises: NaOH 1 mol/L por 15 minutos, água ultra-pura por 15 minutos e eletrólito de corrida por 20 minutos.
- Pré-condicionamento (entre as corridas): NaOH 0,1 mol/L por 3 minutos, água ultra-pura por 3 minutos e eletrólito de corrida por 4 minutos.
- Lavagem no final das atividades: NaOH 0,1 mol/L por 15 minutos seguida de água ultra-pura pelo mesmo tempo.

4.1.4. Injeção e concentração da amostra

As amostras foram injetadas hidrodinamicamente no sistema eletroforético.

Neste modo de injeção, a alíquota introduzida no capilar é representativa da composição da amostra. O volume de injeção (nL) depende do tempo de injeção, das dimensões do capilar, da viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida (TAVARES, 1996).

A injeção hidrodinâmica é mais precisa e robusta que a injeção eletrocinética sendo geralmente afetada apenas se a viscosidade do tampão é drasticamente alterada pela temperatura (ALI; ABOUL-ENEIN; GUPTA, 2006; MAYER, 2001).

O tempo de injeção das amostras foi de 20 segundos à pressão de 50 mbar. Sabe-se que volumes de injeção muito pequenos podem ser responsáveis por introduzir erros quando a amostra é injetada, pois o mecanismo de injeção do próprio equipamento pode limitar a precisão da análise por ser difícil um controle preciso da pressão aplicada para tempos de injeção curtos (MAYER, 2001).

Com tempos de injeção mais longos as diferenças nos níveis de pressão são minimizadas, mas volumes de injeção muito grandes podem prejudicar a separação dos compostos. Uma sobrecarga de amostra pode levar a distorções na forma do pico, a baixa eficiência de separação e a baixa precisão (MAYER, 2001).

Este procedimento de injeção (injeção hidrodinâmica por 20 segundos a pressão de 50 mbar) permitiu que as concentrações mais baixas do fármaco pudessem ser detectadas.

O solvente utilizado para reconstituir o resíduo resultante da evaporação do solvente das amostras foi uma solução metanol/água (30:70 v/v). Esta solução

garantiu adequada solubilização dos resíduos. Além disso, quando uma amostra preparada em uma solução de menor condutividade que o eletrólito de corrida, é injetada hidrodinamicamente no capilar, ocorre um fenômeno denominado *stacking*. Após a injeção são formadas no capilar duas regiões distintas, a região da amostra (menor condutividade) e a região do eletrólito (maior condutividade). Quando a voltagem é aplicada, a força do campo elétrico (que é inversamente proporcional a concentração da solução) na região da amostra é maior, e as espécies carregadas nesta região migram em direção a região do eletrólito com maior velocidade. Então, quando estas espécies atingem a região do eletrólito, onde a força do campo elétrico é menor, elas são desaceleradas o que causa um acúmulo ou “empilhamento” dos íons da amostra (CHIEN; BURGI, 1991; CAO; HONG; CHENG, 2007; SIMONET; RIOS; VALCÁRCEL, 2003). Este “empilhamento” melhora a eficiência do pico, pode melhorar grandemente a resolução (ALTRIA, 1996) e melhora a detectabilidade do analito (HEMPEL, 2000).

4.1.5. Temperatura

Em CE a temperatura é usualmente considerada em um contexto negativo devido à perda da eficiência em virtude do efeito Joule. O efeito Joule é um fenômeno decorrente da aplicação de diferença de potencial ao longo do capilar preenchido com o eletrólito de corrida. Se este calor gerado não for eficientemente dissipado, ele tende a aumentar a temperatura do eletrólito de corrida, causando correntes de convecção no interior do capilar e levando ao alargamento de bandas (TAVARES, 1996). Portanto, o controle da temperatura é comumente usado no sentido de promover eficiente remoção do calor (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993).

Tanto a mobilidade eletroforética como a mobilidade eletrosmótica aumentam com o aumento da temperatura devido a uma mudança na viscosidade das soluções temperatura-induzida (KUHN; HOFFSTETTER-KUHN, 1993). Então, é importante manter a temperatura constante durante uma sequência analítica para se garantir

boa precisão no tempo de migração e na área do pico (ALTRIA, 1996). Assim, a temperatura de 35 °C foi escolhida para continuação dos estudos.

4.1.6. Voltagem aplicada/Corrente

Este parâmetro foi variado entre 15 e 30 kV durante a condução dos estudos, observando o tempo de migração do analito e a obtenção de níveis aceitáveis de corrente.

Voltagens mais altas reduzem o tempo de análise, mas podem levar à perda da resolução e da eficiência da separação se um calor excessivo for gerado dentro do capilar (ALTRIA, 1996)

Foi escolhida a aplicação de 30 kV de voltagem. Esta tensão reduziu o tempo de análise se comparada a tensões mais baixas e gerou uma corrente de aproximadamente 59 μ A.

As condições eletroforéticas descritas acima foram selecionadas utilizando solução padrão de mesilato de imanibe, preparado em metanol. Entretanto, para os estudos posteriores, análise do mesilato de imatinibe em plasma, algumas destas condições podem ser alteradas com o objetivo de adequar a análise para amostras provenientes de material biológico.

4.2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DO IMATINIBE EM PLASMA

4.2.1. Procedimento de preparo da amostras

A preparação de amostras é uma etapa crucial do processo analítico. O objetivo é obter amostras “limpas” e com altos valores de recuperação dos analitos.

O ideal é que a preparação das amostras seja um procedimento simples, não apenas com o objetivo de reduzir o tempo do processo analítico, mas também porque quanto maior o número de passos envolvidos, maior a chance de se introduzir erros.

O procedimento utilizado para preparação de amostra foi a extração líquido-líquido que se baseia na partição do analito entre dois líquidos ou fases imiscíveis: uma fase aquosa e outra orgânica. Os compostos mais hidrofílicos preferem a fase aquosa mais polar enquanto os compostos mais hidrofóbicos são encontrados principalmente na fase orgânica (PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2000).

A seletividade e a eficiência deste processo de extração dependem principalmente da seleção dos solventes. Além disso, outros fatores também podem afetar a distribuição dos solutos entre as duas fases como o pH, a adição de agentes complexantes, a adição de sais (efeito *salting out*), etc (HERNÁNDEZ-BORGES et al., 2007).

Além de ser simples, a ELL promove o *clean up* da amostra, pois as proteínas plasmáticas, que são preocupantes em CE por adsorverem facilmente aos silanóis da parede do capilar, são praticamente insolúveis e precipitam nos solventes orgânicos usados em ELL (PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2000).

Para os fármacos analisados por CE, os quais são normalmente ácidos ou bases fracas, o ajuste de pH é de grande importância na partição dos solutos. Portanto, antes da ELL de compostos básicos, o pH das amostras tem que ser ajustado para o intervalo alcalino, enquanto a ELL de compostos ácidos deve ser conduzida em pH ácido. Estando então nas formas não ionizadas, os ácidos ou bases hidrofóbicos são facilmente extraídos pelos solventes orgânicos (PEDERSEN-BJERGAARD et al., 2000).

Um dos primeiros passos no procedimento de extração foi a adição de solução de hidróxido de sódio 2 mol/L às amostras de plasma, buscando o favorecimento da forma não ionizada do fármaco (que possui caráter básico) e sua extração pelo solvente orgânico.

Inicialmente, quando foram colocados 200 µL desta solução, o plasma formou uma espécie de massa gelatinosa resistente que não permitia o seu contato com o solvente extrator testado. A geleificação do plasma pode ter ocorrido devido a um excesso na quantidade de base adicionada. Passou-se então a adicionar 200 µL de

solução de hidróxido de sódio 1 mol/L. Nestas condições o plasma permaneceu líquido, não houve formação de massa gelatinosa e o volume de 200 µL de solução de NaOH 1 mol/L foi selecionado para dar continuidade ao procedimento de extração.

4.2.2. Seleção do solvente de extração

O solvente extrator adequado para ELL deve ter baixa volatilidade para se evitar perdas durante a extração, ser compatível com o detector empregado, ser de baixa solubilidade ou insolúvel em água e solubilizar adequadamente o analito de interesse (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Foram testados os solventes orgânicos hexano, éter etílico, éter diisopropílico, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, tolueno e éter metil-terc-butílico (MTBE) individualmente e as misturas hexano/acetato de etila (50:50 v/v; 30:70 v/v), hexano/éter etílico (30:70 v/v), tolueno/acetato de etila (80:20 v/v), MTBE/tolueno (70:30 v/v; 90:10 v/v), MTBE/acetato de etila (90:10 v/v).

As amostras de plasma extraídas com éter etílico, acetato de etila, hexano/acetato de etila (50:50 v/v; 30:70 v/v), hexano/éter etílico (30:70 v/v), tolueno/acetato de etila (80:20 v/v) apresentaram aspecto turvo, após a reconstituição do resíduo em solução metanol/água (30:70), e não foram injetadas sob o risco de entupimento do capilar.

O hexano não foi capaz de extrair o imatinibe a partir do plasma. Já o tolueno, o clorofórmio, o diclorometano, o éter diisopropílico e as misturas MTBE/tolueno e MTBE/acetato de etila foram capazes de extrair o fármaco, mas não superaram a eficiência de extração do MTBE que foi eleito o melhor solvente extrator, recuperando aproximadamente 70% do imatinibe (figura 10).

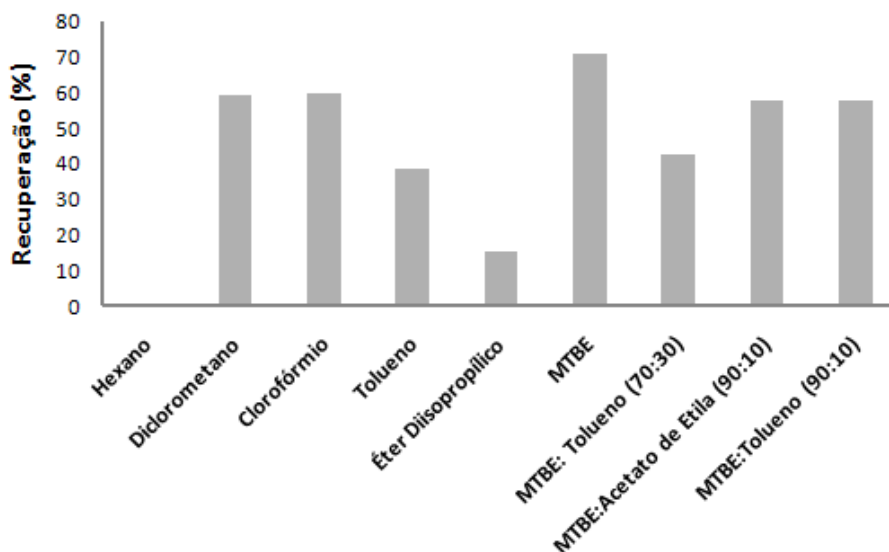


Figura 10. Eficiência de extração dos solventes orgânicos utilizados na extração do imatinibe a partir de amostras de plasma.

4.2.3. Seleção do PI

Após a escolha do solvente extrator, a etapa seguinte foi a seleção do padrão interno, que também deveria ser extraído pelo MTBE.

O PI é uma substância diferente do analito que é adicionado à amostra a ser analisada para auxiliar no processo de quantificação (ARAÚJO et al., 2006).

Um PI adequado pode ser interessante nas análises por CE para corrigir erros que são introduzidos por variações no volume de injeção, na voltagem ou no EOF, além de compensar perdas por evaporação do solvente (MAYER, 2001). Ao invés do valor absoluto da área do pico (ou altura) do composto de interesse, a razão entre sua área e a área do PI é usada na quantificação.

Como critérios de seleção, o padrão interno deve estar completamente separado dos demais compostos presentes na amostra, deve eluir próximo ao analito de interesse, não deve estar presente na amostra original, não deve reagir quimicamente com a amostra e deve estar aproximadamente na mesma concentração do componente a ser quantificado (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2001; HAEFELFINGER, 1981).

Todos os fármacos testados como PI com exceção do acetaminofeno foram extraídos pelo MTBE. Dentre estes, nenhum apresentou tempo de migração inferior ao imatinibe, optamos então por selecionar aquele que além de cumprir com os requisitos acima descritos, apresentou menor tempo de migração, com boa resolução e eficiência. Assim a lidocaína foi selecionada como PI.

4.2.4. Capilar

Nas condições eletroforéticas até então estabelecidas, o tempo total de análise era de aproximadamente 17 minutos, ou seja, a somatória de 10 minutos de pré-condicionamento e 7,0 minutos de análise propriamente dita.

Nesta etapa foi testada a diminuição da dimensão do capilar que passou de 64,5 cm para 46,5 cm de comprimento total e de 56 cm para 38 cm de comprimento efetivo.

A redução das dimensões do capilar não prejudicou a resolução entre os picos do imatinibe, PI e interferentes e possibilitou a redução do tempo de análise para 4,5 minutos.

A etapa de pré-condicionamento, que é feita para remover resíduos da corrida anterior e para que o capilar retorne às condições iniciais de análise, foi reduzida de 3 minutos para 1 minuto de lavagem com NaOH 0,1 mol/L, de 3 para 1 minuto de lavagem com água e de 4 para 2 minutos de lavagem com o tampão de corrida. Esta alteração no pré-condicionamento continuou promovendo a limpeza adequada do capilar, e a repetibilidade dos tempos de migração entre as corridas foi mantida (figura 11). O coeficiente de variação medido para o tempo de migração ao longo de dez corridas consecutivas foi de 0,96% e 0,75% para o imatinibe e o PI respectivamente.

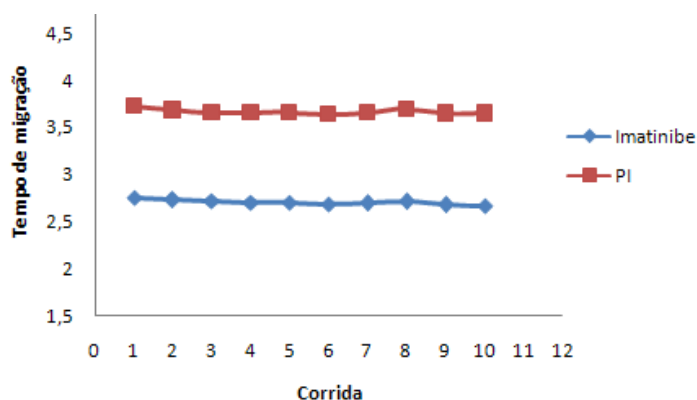


Figura 11. Tempos de migração do imatinibe e PI ao longo de dez corridas consecutivas. Condições eletroforéticas descritas na tabela 1. Pré-condicionamento: 1 minuto de lavagem com NaOH 0,1 mol/L, 1 minuto de lavagem com água e 2 minutos de lavagem com o eletrólito de corrida.

Selecionados o solvente extrator e o PI e feitas as alterações nas dimensões do capilar e no tempo de pré-condicionamento, a etapa seguinte foi a validação do método desenvolvido. A tabela 2 resume as condições finais selecionadas para a análise do mesilato de imatinibe em plasma e a figura 12 ilustra o perfil eletroforético de uma amostra de plasma nestas condições.

Tabela 2 - Condições finais selecionadas para análise do imatinibe em plasma por CE

Parâmetro	Condição
Capilar	46,5 cm comprimento total, 38 cm comprimento efetivo, 50 μ m diâmetro interno
Eletrólito de corrida	Tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5
Injeção	Hidrodinâmica por 20 segundos (50 mbar)
Tensão	30 kV
Temperatura	35 °C
Comprimento de onda	200 nm

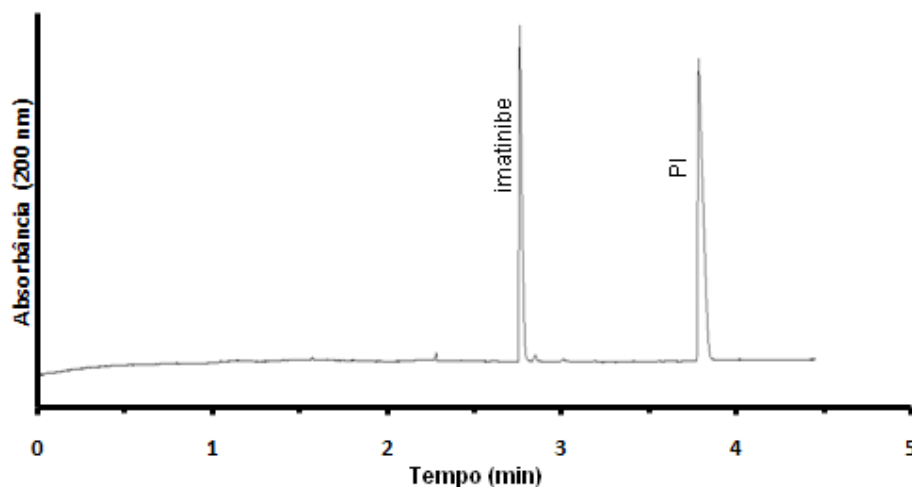


Figura 12. Eletroferograma de plasma enriquecido com 1 $\mu\text{g/mL}$ de imatinibe e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ de PI. Condições eletroforéticas descritas na tabela 2.

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os métodos analíticos empregados na quantificação de fármacos e seus metabólitos em amostras biológicas possuem importante papel na avaliação e interpretação de dados farmacocinéticos, de biodisponibilidade e bioequivalência (SHAH et al., 1992). Neste contexto, frequentemente decisões importantes são tomadas baseadas nos resultados bioanalíticos obtidos (BRAGGIO et al., 1996) sendo então necessário empregar métodos analíticos bem caracterizados e completamente validados que forneçam resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados (SHAH et al., 2000).

A validação de um método bioanalítico é o processo usado para estabelecer que seus parâmetros de desempenho analítico são adequados para o uso pretendido (CAUSON, 1997).

4.3.1. Curva de Calibração e Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico de fornecer resultados (dentro de um determinado intervalo) que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (JIMIDAR; HEYLEN; SMET, 2007).

A curva de calibração/linearidade é determinada a partir da análise de amostras extraídas da matriz, de no mínimo seis concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

Para análise do mesilato de imatinibe foi construído um gráfico de calibração no intervalo de concentração plasmática de 0,25 – 5,00 µg/mL e a linearidade foi determinada no intervalo de concentração plasmática de 0,125 – 5,00 µg/mL, plotando-se no eixo das abscissas a concentração plasmática e no eixo das ordenadas a razão entre as áreas do imatinibe e do PI. Os resultados obtidos foram analisados pelo cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Conforme preconizado pela ANVISA, para métodos bioanalíticos, são aceitáveis para linearidade, coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,98 e os desvios dos valores nominais não devem ser superiores a 15%.

A figura 13 apresenta o gráfico de calibração referente à linearidade para o método proposto, evidenciando que este cumpriu os requisitos acima descritos.

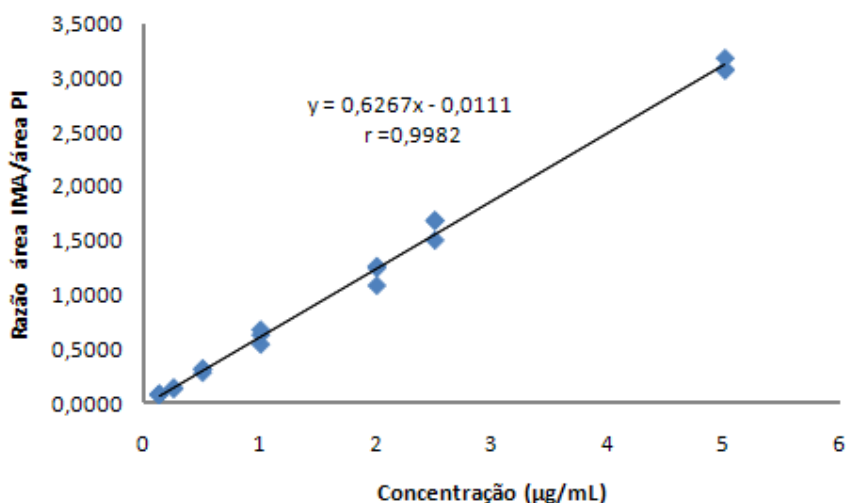


Figura 13. Curva de calibração referente à linearidade do imatinibe no intervalo de concentração plasmática 0,125 a 5,00 µg/mL

4.3.2. Limite de Quantificação (LQ)

É a menor concentração do fármaco quantificável numa amostra com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003; SHAH et al., 2000).

O LQ foi determinado a partir da análise de cinco amostras de plasma branco enriquecidas com o analito na concentração plasmática de 0,125 µg/mL. Este limite de quantificação é adequado para a aplicação do método, uma vez que a concentração plasmática média esperada, para pacientes em uso crônico do medicamento, na dose diária de 400 mg, é próxima a 1 µg/mL.

A tabela 3 apresenta os valores de precisão e exatidão obtidos para este LQ.

Tabela 3 - Limite de quantificação do método para análise do imatinibe em plasma

Concentração plasmática nominal (µg/mL)	IMATINIBE		
	Concentração experimental média (µg/mL) n=5	Exatidão (%Erro)	Precisão (CV%)
0,125	0,126	0,8	3,50

4.3.3. Recuperação

A recuperação é a medida da eficiência do procedimento extração de um método analítico e é obtida comparando-se os resultados de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação (ANVISA, 2003).

O ideal é que os valores de recuperação do analito e do padrão interno sejam próximas de 100%, entretanto valores menores são admitidos desde que a recuperação seja precisa e exata (ANVISA, 2003). Para isso ela é avaliada próximo

aos extremos da curva de calibração e também em uma concentração intermediária (ANVISA, 2003; BRAGGIO et al, 1996), pois a recuperação pode variar com a concentração (MEHTA, 1987).

No método proposto a recuperação do fármaco foi de aproximadamente 67% e o coeficiente de variação foi inferior a 15% para os três níveis de concentração avaliados (tabela 4). Em relação ao padrão interno a recuperação média obtida foi de 95,6% com coeficiente de variação de 6,6%.

Tabela 4 - Recuperação do método para análise do imatinibe em plasma

Concentração plasmática nominal ($\mu\text{g/mL}$) n=5	IMATINIBE	
	Recuperação média (%)	CV(%)
0,50	66,03	10,99
2,00	68,52	10,69
5,00	67,15	7,70
Média	67,23	9,79

4.3.4. Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de repetibilidade entre análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio (ANVISA, 2003).

O termo precisão descreve a distribuição de resultados individuais ao redor de suas médias. É expressa como porcentagem do coeficiente de variação (% CV) ou como o desvio padrão relativo das replicatas (CAUSON, 1997).

A precisão interensaio foi avaliada em três dias consecutivos e a precisão intraensaio foi avaliada no mesmo dia. As amostras foram preparadas em sextuplicata, contemplando os níveis de concentração alto, médio e baixo da faixa linear do método. Como pode ser visto pela tabela 5, os valores de CV (%) encontrados foram inferiores a 15% nos três níveis de concentração, como preconizado pela legislação vigente, a resolução 899 da ANVISA (ANVISA, 2003).

Tabela 5 - Precisão intra e interensaio do método para análise do imatinibe em plasma

Concentração plasmática nominal ($\mu\text{g/mL}$)	IMATINIBE	
	Concentração experimental média ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (CV%)
Intraensaio (n=6)		
0,50	0,43	5,64
2,00	2,11	7,11
5,00	5,53	6,32
Interensaio (3 dias, n=18)		
0,50	0,47	12,75
2,00	2,18	11,99
5,00	5,18	6,68

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (ANVISA, 2003). É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

No método proposto a exatidão também foi avaliada inter e intraensaio assim como na precisão, e os valores de desvio em relação a concentração nominal encontrados foram inferiores a 15% nos três níveis de concentração (tabela 6), cumprindo com os requisitos da legislação vigente (ANVISA, 2003).

Tabela 6 - Exatidão intra e interensaio do método para análise do imatinibe em plasma

Concentração plasmática nominal ($\mu\text{g/mL}$)	IMATINIBE	
	Concentração experimental média ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%Erro)
Intraensaio (n=6)		
0,50	0,43	-14,0
2,00	2,11	5,5
5,00	5,53	10,6
Interensaio (3 dias, n=18)		
0,50	0,47	-6,0
2,00	2,18	9,0
5,00	5,18	3,6

4.3.5. Estabilidade

Este parâmetro visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (ANVISA, 2003).

Perdas do analito podem ocorrer por degradação química, fotoquímica ou enzimática durante o armazenamento. Portanto, a investigação da estabilidade do fármaco e de seus metabólitos na matriz biológica durante o armazenamento (temperatura e tempo) é parte crucial da validação do método (PETER; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007).

A estabilidade do analito foi avaliada após ciclos de congelamento e descongelamento (tabela 7), armazenagem de longa duração (tabela 8) e nas condições da análise (tabela 9), conforme preconizado pela RDC 899 da ANVISA (2003).

Os resultados obtidos foram comparados, pelo teste estatístico ANOVA, com aqueles resultantes de amostras recém-preparadas.

Tabela 7 - Estabilidade do imatinibe em plasma após ciclos de congelamento e descongelamento

Concentração plasmática nominal (µg/mL)	CICLO DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO (n=6)	
	Valor - P	CV%
0,50	0,143	13,60
5,00	0,198	4,72

Tabela 8 - Estabilidade do imatinibe em plasma após armazenagem de longa duração (7 dias)

Concentração plasmática nominal (µg/mL)	ARMAZENAGEM DE LONGA DURAÇÃO (n=6)	
	Valor - P	CV%
0,50	0,761	8,33
5,00	0,322	8,76

Tabela 9 - Estabilidade do imatinibe em plasma após armazenagem de curta duração (12 horas)

Concentração plasmática nominal ($\mu\text{g/mL}$)	ARMAZENAGEM DE CURTA DURAÇÃO (n=6)	
	Valor - P	CV%
0,50	0,566	10,50
5,00	0,602	8,54

Os valores de p encontrados em todas as condições de estabilidade estudadas foram maiores do que 0,05 e os valores de CV foram inferiores a 15%. Os resultados demonstraram que o mesilato de imatinibe manteve-se estável nas condições avaliadas, pois não houve diferença significativa entre os resultados obtidos das amostras submetidas ao teste de estabilidade e as amostras recém-preparadas.

4.3.6. Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade deste avaliar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma matriz complexa, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da própria matriz (RIBANI et al., 2004).

A seletividade foi avaliada através da comparação de amostras extraídas de plasma livres do imatinibe e amostras enriquecidas com o fármaco e o padrão interno. Neste estudo foi demonstrada a ausência de compostos interferentes no tempo de migração do imatinibe e do padrão interno, indicando que o método é seletivo (figura 14).

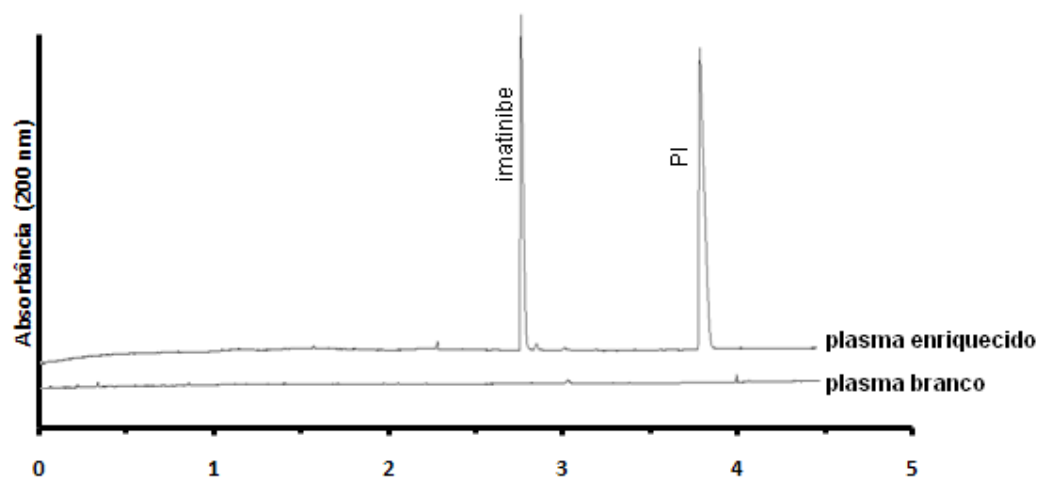


Figura 14. Eletroferogramas referentes às amostra de plasma branco e plasma enriquecido com imatinibe e PI. Condições eletroforéticas descritas na tabela 1.

4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO E VALIDADO

Para demonstrar a utilidade do método proposto este foi aplicado na análise de amostras de plasma de pacientes com LMC. A tabela 9 demonstra os valores encontrados:

Tabela 10 – Determinação da concentração plasmática de imatinibe em plasma de pacientes portadores de LMC em tratamento com Glivec.

Paciente	Concentração plasmática de imatinibe ($\mu\text{g/mL}$)
ERC	0,98
LMO	1,22
LBS	0,46
SARA	0,35
RM	0,42
OROZ	0,63
GCF	4,98
SHBT	0,44
DAS	1,33
FAR	0,37
PES	1,01
TAC	0,88
LBS	0,30
NCM	1,02
ACP	2,07
EAP	0,41
NLC	1,90
LPS	1,14
PNS	0,98
LGO	0,53
VIL	1,31
LUCI	0,19
ECS	0,99
CABG	0,50
HAC	0,45
VRE	0,68

A figura 15 mostra o perfil eletroforético de uma amostra de plasma de um paciente (identificado com o código PES), portador de LMC em tratamento com Glivec na dose diária de 400 mg. A concentração plasmática do mesilato de imatinibe encontrada neste paciente foi de 1,01 µg/mL.

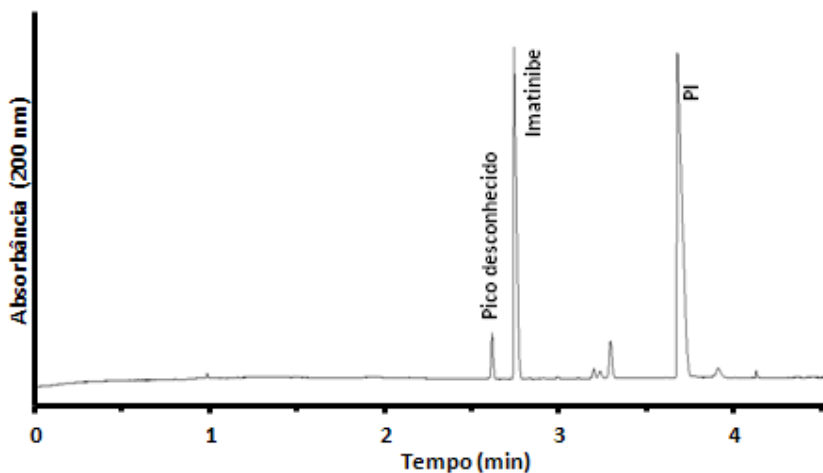


Figura 15. Eletroferograma de amostra de plasma de paciente (dosagem de 400 mg de Glivec). Condições eletroforéticas: Tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5, voltagem de 30 kV, temperatura do capilar 35 °C, injeção hidrodinâmica por 20 s (50 mbar).

No eletroferograma é possível observar a presença de um pico cuja substância migrou antes do mesilato de imatinibe. Como anteriormente descrito, o mesilato de imatinibe é metabolizado no fígado principalmente pelo CYP 3A4 e o principal metabólito circulante é o derivado piperazínico N-desmetilado, CGP74588, que representa aproximadamente 20% da concentração plasmática do fármaco nos pacientes (LARSON et al., 2008).

Devido à indisponibilidade deste metabólito, não foi possível confirmar com exatidão a identidade deste pico. Entretanto, algumas observações sugerem que este corresponda ao metabólito CGP74588.

O mesilato de imatinibe diferencia-se estruturalmente de seu metabólito pela presença de um radical metil (figura 6). Assim, considerando o mecanismo de separação por CE, espera-se que o metabólito migre antes do fármaco por apresentar maior relação carga/massa.

O espectro de absorção do pico desconhecido foi comparado ao espectro de absorção do pico do padrão de imatinibe e como observado na figura 16, estes espectros se mostraram muito semelhantes, indicando uma similaridade entre suas estruturas.

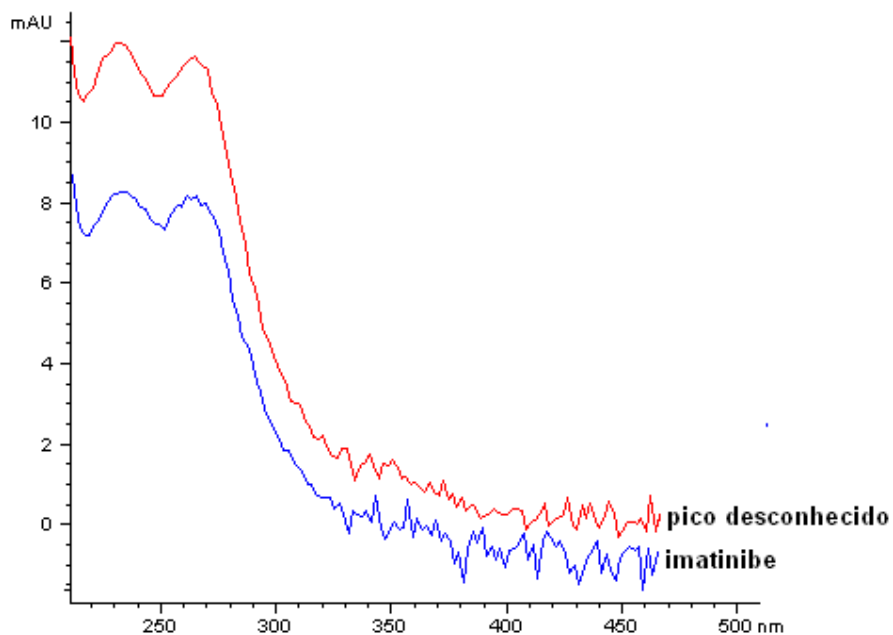


Figura 16. Espectro de absorção correspondente ao pico desconhecido (vermelho) e ao pico do imatinibe (azul).

Assim, diante do exposto acima, podemos sugerir que o pico observado no eletroferograma da amostra de plasma do paciente é o metabólito CGP74588.

5- CONCLUSÕES

Ao final do trabalho e considerando os objetivos propostos pôde-se concluir que:

- Foi possível o desenvolvimento de um método para análise do mesilato de imatinibe em plasma utilizando a eletroforese capilar.
- A condição eletroforética estabelecida utilizou um capilar de sílica (46,5 cm de comprimento total, 38 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno), tampão fosfato de sódio 50 mmol/L, pH 2,5 como eletrólito de corrida, injeção hidrodinâmica por 20 s a pressão de 50 mbar, voltagem de 30 kV, temperatura de 35 °C e detecção em 200 nm (λ).
- O procedimento de preparo da amostra foi baseado na extração líquido-líquido, utilizando como solvente extrator o éter metil-*terc*-butílico que forneceu *clean up* satisfatório das amostras e os interferentes que ainda foram extraídos da matriz foram bem resolvidos em relação ao fármaco e ao PI analisados.
- Os parâmetros de desempenho analítico, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limite de quantificação, especificidade e estabilidade avaliados na validação do método, cumpriram os requisitos preconizados na legislação vigente, a Resolução 899 da ANVISA (2003). Portanto, o método desenvolvido foi validado com sucesso.
- A aplicação do método proposto foi demonstrada na análise de amostras reais de plasma de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Crônica.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, S. Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M.I. **Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis**. Elsevier Inc, cap. 1, p. 1-8, 2008.
- ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y.; GUPTA, V.K. Precision in capillary electrophoresis. **Analytical Letters**, Philadelphia, v. 39, n. 11, p. 2345-2357, 2006.
- ALTRIA, K.D. **Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, operation and applications**. New Jersey: 1996. 349 p.
- ALTRIA, K.D.; FABRE H. Approaches to optimization of precision in capillary electrophoresis. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 40, n. 5/6, p. 313-320, 1995.
- ANASTOS, N.; BARNETT, N.W.; LEWIS, S.W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, Amsterdam, v. 67, p. 269-279, 2005.
- APPERLEY, J.F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. **The Lancet Oncology**, Nova Iorque, v. 8, p. 1018-1029, 2007.
- ARAÚJO, P.; COUILLARD, F.; LEIRNES, E.; ASK, K.; BOKEVOLL, A.; FROYLAND, L. Experimental design considerations in quantification experiments by using the internal standard technique: Cholesterol determination by gas chromatography as a case study. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1121, p. 99-105, 2006.
- AWIDI, A.; SALEM, I.I.; NAJIB, N.; MEFLEH, R.; TARAWNEH, B. Determination of imatinib plasma levels in patients with chronic myeloid leukemia by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method's comparison. **Leukemia Research**, Oxford, v. 34, p. 714-717, 2010.
- BACCARANI, M.; SAGLIO, G.; GOLDMAN, J.; HOCHHAUSS, A.; SIMONSSON, B.; APPELBAUM, F.; APPERLEY, J.; CERVANTES, F.; CORTES, J.; DEININGER, M.; GRATWOHL, A.; GULHOT, F.; HOROWITZ, M.; HUGHES, T.; KANTARJIAN, H.; LARSON, R.; NIEDERWIESER, D.; SILVER, R.; HEHLMANN, R. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the european leukemiaNet. **Blood**, Washington, v. 108, n. 6, p. 1809-1820, 2006.

BAHKTIAR, R.; KHEMANI, L.; HAYES, M.; BEDMAN, T.; TSE, F. Quantification of the antileukemia 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**, Amsterdam, v. 28, p. 1183-1194, 2002.

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**, Amsterdam, v. 768, p. 325-340, 2002.

BARBOZA, L.P.; SOUZA, J.M.; SIMÕES, F.V.; BRAGANÇA, I.C.; ABDELHAY, E. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 89-98, 2000.

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

BOODY, A.V.; SLUDDEN, J.; GRIFFIN, M.J.; GARNER, C.; KENDRICK, J.; MISTRY, P.; DUTREIX, C.; NEWELL, D.R.; O'BRIEN, S.G. Pharmacokinetic investigation of imatinib using accelerator mass spectrometry in patients with chronic myeloid leukemia. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 13, n. 14, p. 4164 – 4169, 2007.

BOONE, C.M.; WATERVAL, J.C.M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W.J.M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs – a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 20, p. 831-863, 1999.

BORGES, J.H.; BORGES-MIGUEL, T.M.; RODRIGUEZ-DELAGADO, A.R.; CIFUENTES, A. Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, p. 214-226, 2007.

BRAGGIO, S.; BARNABY, R.J.; GROSSI, P.; CUGOLA, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 14, p. 375-388, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BREADMORE, M.C. Eletrokinetic and hydrodynamic injection: making the right choice for capillary electrophoresis. *Bioanalysis*, Londres, v. 1, n. 5, p. 889-894, 2009.

CAO, J.; HONG, F.; CHENG, P. Numerical analysis on the influence factors of sample stacking in capillary electrophoresis. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 25, n. 2, p. 183-188, 2007.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis-Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 686, p. 175-180, 1997.

CHABNER, B.A.; AMREIN, P.C.; DRUKER, B.J.; MICHAELSON, M.D.; MITSIADES, C.S.; GOSS, P.E.; RYAN, D.P.; RAMACHANDRA, S.; RICHARDSON, P.G.; SUPKO, J.G., WILSON, W.H. Agentes antineoplásicos. In: Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: MCGRAW, H., 2007, p. 1185-1264.

CHIEN, R.L.; BURGI, D.S. Field amplified sample injection in high performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 559, p. 141-152, 1991.

COHEN, M.H.; WILLIAMS, G.; JOHNSON, J.R.; DUAN, J.; GOBBURU, J.; RAHMAN, A.; BENSON, K.; LEIGHTON, J.; KIM, S.K.; WOOD, R.; ROTHMANN, M.; CHEN, G.; U, K.M.; STATEN, A.M.; PAZDUR, R. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 8, p. 935-942, 2002.

CRUCES-BLANCO, C.; GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; Applications of capillary electrophoresis in forensic analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 215-226, 2007.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E.M.; BOSQUE-SENDRA, J.M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 11, p. 620-636, 2001.

DAVIES, A.; HAYES, A.K.; KNIGHT, K.; WATMOUGH, S.J.; PIRMOHAMED, M.; CLARK, R.E. Simultaneous determination of nilotinib, imatinib and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma by ultra-violet high performance liquid chromatography. **Leukemia Research**, Oxford, v. 34, p. 702-707, 2010.

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**, Amsterdam, v. 877, p. 1721–1726, 2009.

DEININGER, M.W.N.; DRUKER, B.J. Specific targeted therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with imatinib. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 55, n. 3, p. 401-423, 2003.

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**, Waltham, v. 344, n. 14, p. 1031-1037, 2001.

DRUKER, B.J. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 38, n. 5, p. S70-S76, 2002.

FALLER, T.; ENGELHARDT, H. How to achieve higher repeatability and reproducibility in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 853, p. 83-94, 1999.

FEKETE, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Capillary Electrophoresis. In: PICÓ, Y. **Food Toxicants Analysis**. Elsevier Inc., cap. 15, p. 561-597, 2007.

FRONTIERS IN BIOSCIENCE. Representação do modelo da dupla camada. Disponível em <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3500/figures.htm>

GLIVEC: mesilato de imatinibe. Suíça: Novartis Pharma Stein AG. Bula de remédio.

GOLDMAN, J.M. Chronic Myeloid Leukaemia. **Medicine**, Philadelphia, v. 37, n.4, p.195-197, 2009.

GÓMEZ, J.E.; SANDOVAL, J.E. The effect of conditioning of fused-silica capillaries on their electrophoretic performance. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 29, p. 381-392, 2008.

GSCHWIND, H.P.; PFAAR, U.; WALDMEIER, F.; ZOLLINGER, M.; SAYER, C.; ZBINDEN, P.; HAYES, M.; POKORNY, R.; SEIBERLING, M.; BEN-AM, M.; PENG, B.; GROSS, G. Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, n. 10, p. 1503-1512, 2005.

GUETENS, G.; DE BOECK, G.; HIGHLEY, M.; DUMEZ, H.; OOSTEROM, A.T.V.; DE BRUIJN, E.A. Quantification of the anticancer agent STI-571 in erythrocytes and plasma by measurement of sediment technology and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1030, p. 27-34, 2003.

GUETENS, G.; PRENEN, H.; DE BOECK, G.; VAN OOSTEROM, A.; SCHOFFSKI, P.; HIGHLEY, M.; DE BRUIJN, E.A. Simultaneous determination of AMN 107 and imatinib in cultured tumour cells using an isocratic high performance liquid chromatography procedure with UV detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 846, p. 341-345, 2007.

HADLEY, M.; GILGES, M.; SENIOR, J.; SHAH, A.; CAMILLERI, P. Capillary electrophoresis in the pharmaceutical industry: applications in discovery and chemical development. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 745, p. 177-188, 2000.

HAEFELFINGER, P. Limits of the internal standard technique in chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 218, p. 73-81, 1981.

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 new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 877, p. 1982-1996, 2009.

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

HEMPEL, G. Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 691-698, 2000.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T.M.; RODRIGUEZ-DELGADO, M.A.; CIFUENTES, A. Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, p. 214-226, 2007.

ISSAQ, H.J. A decade of capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 1921-1939, 2000.

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

JANINI, G.M.; ISSAQ, H.J. The buffer in capillary zone electrophoresis. In: Norberto A. Guzman. **Capillary Electrophoresis Technology**. Nova Iorque: MARCEL DEKKER, INC., 1993, p. 119-160.

JIMIDAR, M.I. Theoretical considerations in performance of various modes of CE. **Separation Science and Technology**, Philadelphia, v. 9, p. 9-42, 2008

JIMIDAR, MI.; HEYLEN, P.; SMET, M.D. Method validation. **Separation Science and Technology**, Philadelphia, v. 8, p. 441-458, 2007.

KUJAWSKI, L.A.; TALPAZ, M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. **Cytokine & Growth Factors Reviews**, Oxford, v. 18, p. 459-471, 2007.

KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 4, 2003.

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. Capillary Electrophoresis principles and practice. Alemanha: Springer-Verlag, 1993. 370 p.

LABORATOIRE SUISSE D'ANALYSE DU DOPAGE. Representação da separação por CE. Disponível em: http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm

LARSON, R.A.; DRUKER, B.J.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, S.G.; RIVIERI, G.J.; KRAHNKE, T.; GATHMANN, I.; WANG, Y. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. **Blood**, Washington, v. 111, n. 8, p. 4022-4028, 2008.

LEHMANN, R.; VOELTER, W.; LIEBICH, H.M. Capillary electrophoresis in clinical chemistry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 697, p. 3-35, 1997.

LI, S.F.Y. **Capillary Electrophoresis: Principles, practice and applications**. Amsterdam: Elsevier, 1993. 583 p.

MALLAMPATI, S.; PAUWELS, J.; HOOGMARTENS, J.; VAN SCHEPDAEL, A. CE in impurity profiling of drugs. **Separation Science and Technology**, Philadelphia, v. 9, p. 259-315, 2008.

MAYER, B.X.; How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 907, p. 21-37, 2001.

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**, Amsterdam, v. 1031, p. 243-248, 2004.

MEHTA, A.C. Drug determination in biological fluids – approaches to method validation. **Talanta**, Amsterdam, v. 34, n. 7, p. 609-613, 1987.

MEHTA, A.C. The how and why of therapeutic drug monitoring. **Analytical Proceedings Including Analytical Communications**, v. 32, p. 347-351, 1995.

MELO, J.V.; CHUAH, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 249, p. 121-132, 2007.

O'BRIEN, S.G.; GUILHOT, F.; LARSON, R.A.; GATHMANN, I.; BACCARANI, M.; CERVANTES, F.; CORNELISSEN, J.J.; FISCHER, T. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 348, p.994-1004, 2003.

O'DWYER, M.E.; DRUKER, B.J. STI571: an inhibitor of the bcr-abl tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. **Lancet Oncology**, Nova Iorque, v. 1, p. 207-211, 2000.

O'FLAHERTY, B. NUNNALLY, B.K. Equipment considerations for capillary electrophoresis. **Separation Science and Technology**, Philadelphia, v. 9, p. 43-62, 2008.

OOSTENDORP, R.L.; BEIJNEM, J.H.; SCHELLENS, J.H.M.; VAN TELLINGEN, O. Determination of imatinib mesylate and its main metabolite (CGP74588) in human plasma and murine specimens by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, Sussex, v. 21, p. 747-754, 2007.

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**, Amsterdam, v. 791, p. 39-44, 2003.

PEDERSEN-BJEGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E.; HALVORSEN, T.G. Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 902, p. 91-105, 2000.

PENG, B.; LLOYD, P.; SCHRAN, H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v.9, n. 44, p. 879-894, 2005.

PENG, B.; HAYES, M.; RESTA, D.; RACINE-POON, A.; DRUKER, B.J.; TALPAZ, M.; SAWYERS, C.L.; ROSAMILIA, M.; FORD, J.; LLOYD, P.; CAPDEVILLE, R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, p. 935-942, 2004.

PETERS, F.T.; DRUMMER, O.H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, Irlanda, v. 165, p. 216-224, 2007.

RADICH, J.P.; HONGYUE, D.; MAO, M.; OEHLER, V.; SCHELTER, J.; DRUKER, B.; SAWYERS, C.; SHAH, N.; STOCK, W.; WILLMAN, C.L.; FRIEND, S.; LINSLEY, P.S. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v. 103, n. 8, p. 2794–2799, 2006.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fiber-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, p. 1-10, 2004.

REN, R. Mechanisms of bcr-abl in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. **Nature**, Londres, v. 5, p. 172-183, 2005.

RODRIGUEZ-FLORES, J.; BERZAS, J.J.; CASTAÑEDA, G.; RODRÍGUEZ, N. Direct and fast capillary zone electrophoretic method for the determination of Gleevec and its main metabolite in human urine. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 794, p. 381-388, 2003.

RODRIGUEZ-FLORES, J.; NEVADO, J.J.B.; SALCEDO, A.M.C.; DÍAZ, M.P.C. Nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of Gleevec and its main metabolite in human urine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1068, p. 175-182, 2005.

ROSASCO, M.; MOYANO, M.; PIZZORNO, M.; SEGALL, A. Validation of an HPLC method for the determination of imatinib mesylate in pharmaceutical dosage. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, Philadelphia, v. 28, n. 20, p. 3283-3292, 2005.

ROTH, O.; SPREUX-VAROUQUAUX, O.; BOUCHET, S.; ROUSSELOT, P.; CASTAIGNE, S.; RIGAUDEAU, S.; RAGGUENEAU, V.; THEROND, P.; DEVILLIER, P.; MOLLIMARD, M.; MANEGLIER, B. Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: comparison with LC/MS-MS. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 411, p. 140-146, 2010.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.A.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N.; POWELL, M.L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A. Bionalytical method validation – a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, Nova Iorque, v. 17, p. 1551-1557, 2000.

SCHLEYER, E.; PURSCHE, S.; KÖHNE, C.H.; SCHULER, U.; RENNER, U.; GSCHAIÐMEIER, H.; FREIBERG-RICHTER, J.; LEOPOLD, T.; JENKE, A.; BONIN, M.; BERGEMANN, T.; LE COUTRE, P.; GRUNER, M.; BORNHÄUSER, M.; OTTMANN, O.G.; EHNINGER, G. Liquid chromatographic method for detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cell preparations. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 799, p. 23-36, 2004.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SIMONET, B.M.; RÍOS, A.; VALCÁRCEL, M. Enhancing sensitivity in capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 22, n. 10, 2003.

SNIEHOTTA, M.; SCHIFFER, E.; ZÜRBIG, P.; NOVAK, J.; MISCHAK, H. CE-a multifunctional application for clinical diagnosis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 28, p.1407-1417, 2007.

SOUZA, C.A.; PAGNANO, K. Os desafios no tratamento da leucemia mielóide crônica na era do mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 282-284, 2004.

SZCZEPEK, W.J.; KOSMACINSKA, B.; BIELEJEWSKA, A.; LUNIEWSKI, W.; SCARZYNSKI, M.; ROZMARYNOWSKA, D. Identification of imatinib mesylate degradation products obtained under stress conditions. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, p. 1682-1691, 2007.

SWINNEY, K.; BORNHOP, D.J. Detection in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 1239-1250, 2000.

TAGLIARO, F.; TURRINA, S.; SMITH, F.P. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. **Forensic Science International**, Irlanda, v. 77, p.211-229, 1996.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n.52, p. 493-511, 1997.

TITIER, K.; PICARD, S.; DUCINT, D.; TEILHET, E.; MOORE, N. BERTHAUD, P.; MAHON, F.X.; MOLIMARD, M. Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography –tandem mass spectrometry. **Therapeutic Drug Monitoring**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 634-640, 2005.

VADERA, N.; SUBRAMANIAN, G.; MUSMADE, P. Stability-indicating HPTLC determination of imatinib mesylate in bulk drug and pharmaceutical dosage-form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, p. 722-726, 2007.

VELPANDIAN, T.; MATHUR, R.; AGARWAL, N.K.; ARORA, B.; KUMAR, L.; GUPTA, S.K. Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for determination of Imatinib in biological samples. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 804, p. 431-434, 2004.

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**, Amsterdam, v. 33, p. 879-889, 2003.

VOLPE, G.; PANUZZO, C.; ULISCIANI, S.; CILLONI, D. Imatinib resistance in CML. **Cancer Letters**, Irlanda, v. 274, p. 1-9, 2009.

WIDMER, N.; BÉGUIN, A.; BUCLIN, R.T.; KOVACSOVICS, T.; DUCHOSAL, M.A.; LEYVRAZ, S.; ROSSELET, A.; BIOLLAZ, J.; DECOSTERD, L.A. Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 803, p. 285-292, 2004.

