

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA
EM COMPRIMIDOS**

AMANDA THOMAS BARDEN

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA
EM COMPRIMIDOS**

Dissertação apresentada por **AMANDA
THOMAS BARDEN** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2010

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.11.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr. Ana Maria Bergold
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Andreas S. L. Mendez
Universidade Federal do Pampa (Unipampa)

Prof. Dr. Tércio Paschke Oppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

B245d Barden, Amanda Thomas

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de vildagliptina em comprimidos / Amanda Thomas Barden – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xvi, 99 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Vildagliptina. 2. Validação : Métodos de análise de fármacos. 3. Controle de qualidade de medicamentos. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 5. Espectrofotometria ultravioleta 6. Degradação. 8. Estabilidade. I. Steppe, Martin. II. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:
Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ/LCQFar) de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com bolsa de estudos financiada pela CAPES.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Martin Steppe pela orientação e pela dedicação oferecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Elfrides E. S. Schapoval pelo exemplo de vida e de profissionalismo.

Aos professores Nadia Volpato, Tércio Oppe e Célia Chaves pela disponibilidade e auxílios prestados.

Aos colegas do LEPCQ: Bárbara, Cássia, Clésio, Diogo, Fernanda, Franciele, Gabriela, Heloísa, Jamila, Jéferson, Marcelo, Mariana, Maximiliano, Nathalie, Rúbia e Vítor.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico: Alianise, Leila e Lorena.

Às colegas Alini e Letícia pelo convívio e auxílio sempre que precisei.

Às amigas Amanda e Thatiana pelas conversas e trocas de idéias nas horas de desespero e pelos momentos de descontração.

Ao Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da UFRGS pela disponibilidade de utilização do espectrômetro de massas e, em especial, à amiga Maiara pela ajuda prestada na utilização do equipamento.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação, à Faculdade de Farmácia da UFRGS e a todos os professores e funcionários dessa instituição.

Aos meus pais, em especial a minha mãe Vânia, e ao meu irmão Alisson, pela compreensão, incentivo e principalmente pelo apoio na realização dos meus sonhos.

RESUMO

Objetivos: os objetivos gerais deste trabalho foram desenvolver, validar e comparar métodos analíticos para caracterização e determinação quantitativa de vildagliptina (VLG) na forma farmacêutica comprimidos, assim como determinar a cinética de degradação do fármaco em condição de estresse. **Métodos:** método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) foi desenvolvido e validado, conforme as normas da International Conference on Harmonisation (ICH). A cinética de degradação do fármaco foi determinada frente à hidrólise alcalina. A possível estrutura do produto de degradação majoritário, formado sob condições básicas, oxidativas e térmicas foi proposta de acordo com análises realizadas por espectrometria de massas (EM). Foi desenvolvido e validado, também, método por espectrofotometria ultravioleta derivada para quantificação do fármaco na forma farmacêutica. **Resultados e Conclusões:** o método de CLAE indicativo de estabilidade desenvolvido e validado demonstrou ser adequado para a quantificação da substância ativa na forma farmacêutica sem sofrer a interferência dos excipientes presentes na formulação e também na presença dos produtos de degradação. Os principais fatores extrínsecos que promoveram a degradação do fármaco foram: oxidação, hidrólise alcalina e temperatura. Determinou-se a cinética de degradação, sob condições alcalinas, como sendo de primeira ordem indicando, assim, que o processo de degradação é dependente da concentração de fármaco. O método por espectrofotometria UV derivada também se mostrou adequado para a quantificação de vildagliptina nos comprimidos. A comparação entre os métodos desenvolvidos não mostrou diferença estatística significativa demonstrando que ambos os métodos podem ser utilizados para determinação de vildagliptina no controle de qualidade dos comprimidos.

Palavras-chave: vildagliptina, cromatografia líquida de alta eficiência, validação, estabilidade e espectrofotometria ultravioleta derivada.

ABSTRACT

Development and validation of analytical methods for determination of vildagliptin in tablets

Objectives: the aim of the present work was to develop, validate and compare analytical methods to characterization and quantitative determination of vildagliptin (VLG) in tablet dosage form, as well as to determinate the degradation kinetics of the drug in a stress condition. **Methods:** stability-indicating method for the analysis of VLG by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection was developed and validated according to the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines. The degradation kinetics of the drug under the alkaline hydrolysis was determined. The possible molecular structure of the major degradation product obtained under the stress studies by alkaline hydrolysis, oxidation and thermal degradation was predicted by mass spectrometry (MS). **Results and Conclusions:** The developed stability-indicating method was adequate to determine the active substance in the formulation even in the presence of the excipient ingredients in the formulation and, also, in the presence of the degradation products. The main extrinsic factors which promoted the drug degradation were: oxidation, alkaline hydrolysis and thermal degradation. The degradation kinetics was determined, under alkaline conditions, as first order showing that the process is dependent on the drug concentration. The derivative spectrophotometric method also was adequate to the quantification of vildagliptin in tablets. There was no statistical significant difference between the methods demonstrating that both methods can be used for the determination of vildagliptin in quality control of pharmaceutical tablets.

Keywords: vildagliptin, high performance liquid chromatography, validation, stability, and derivative spectrophotometric method.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA:

Figura 1. Estratégias para desbloquear o potencial terapêutico das incretinas hormonais.....	15
Figura 2. Estrutura química da vildagliptina.....	16
Figura 3. Metabolismo do GLP-1 e seus efeitos no estado pós-prandial.....	19

Capítulo I. Caracterização e identificação de vildagliptina

Figura 1.1. Curva de aquecimento de VLG SQR realizada por DSC.....	37
Figura 1.2. Espectro no IV da VLG SQR	38
Figura 1.3. Espectro de RMN ¹ H em DMSO _{d6} da VLG SQR	40
Figure 1.4. Estrutura química de VLG e respectivas atribuições do espectro de RMN ¹ H em DMSO _{d6}	41
Figure 1.5. Cromatograma e valores de R _f obtidos por CCD na análise de VLG SQR, VLG extraída dos comprimidos e sitagliptina com revelação por vapor de iodo.....	43
Figure 1.6. Cromatograma do padrão (A) e amostra (B) de VLG.....	45
Figure 1.7. Espectros na região UV sobrepostos do padrão (A) e amostra (B) de VLG.	46

Capítulo II. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV para análise de vildagliptina em comprimidos e estudo de estabilidade

Artigo submetido: *Stability-indicating RP-LC Method for the Determination of Vildagliptin and Its Degradation Products*

Figure 1. Chemical structure of vildagliptin (VLG).....	53
Figure 2A-B. Representatives RP-LC chromatograms of vildagliptin (VLG) reference substance solution and overlap of mobile-phase (A); sample solution and overlap of placebo solution (B). Chromatographic conditions: XBridge™ C8 column (150 × 4.6 mm, 5 μm), 25 °C; mobile phase: triethylamine (0.3%; pH 7.0)/acetonitrile (85:15; v/v); flow rate: 1.0 mL min ⁻¹ ; detection: 207 nm.	61
Figure 3A-F. RP-LC chromatograms obtained of vildagliptin drug product (VLG; 50μg mL ⁻¹). (A) acidic hydrolysis; (B) basic hydrolysis; (C) oxidative degradation; (D)	

photodegradation; **(E)** thermal degradation. Peak 1: VLG, 2: degraded form, 3: hydrogen peroxide. Chromatographic conditions: XBridge™ C8 column (150 × 4.6 mm, 5 μm), 25 °C; mobile phase: triethylamine (0.3%; pH 7.0)/acetonitrile (85:15; v/v); flow rate: 1.0 mL min⁻¹; detection: 207 nm 63

Figure 4A-E. Mass spectra obtained to vildagliptin. **(A)** reference substance; **(B)** sample; **(C)** thermal degradation; **(D)** basic hydrolysis; **(E)** oxidative degradation . 65

Figure 5. Possible major degradation product formed in all degradation conditions 66

Figure 6A-C. Values of concentration, concentration log and concentration reciprocal of the remaining VLG versus time (A) zero-order reaction; (B) first-order reaction; (C) values second-order reaction 70

Capítulo III. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria UV derivada para análise de vildagliptina em comprimidos

Artigo submetido: *UV derivative method for determination of vildagliptin in tablets using an Experimental Design and comparison with HPLC*

Figure 1. Chemical structure of VLG..... 79

Figure 2. UV spectra to the placebo and VLG solutions (sobreposition)..... 86

Figure 3. UV derivative spectra obtained to the placebo and VLG solutions (sobreposition)..... 87

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA:

Tabela 1. Lista de países com os maiores números de casos de diabetes para 2000 e 2030.....	10
Tabela 2. Classificação etiológica da DM	11

Capítulo I. Caracterização e identificação do padrão de vildagliptina

Tabela 1.1. Determinação da solubilidade para VLG SQR	36
Tabela 1.2. Atribuição das principais bandas do espectro da VLG na região do IV	39
Tabela 1.3. Atribuições do espectro de RMN ¹ H da VLG em DMSO _{d6}	40
Tabela 1.4. Condições cromatográficas utilizadas.....	44

Capítulo II. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV para análise de vildagliptina em comprimidos e estudo de estabilidade

Artigo submetido: *Stability-indicating RP-LC Method for the Determination of Vildagliptin and Its Degradation Products*

Table 1. Factors and levels investigated during robustness testing.....	59
Table 2. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for vildagliptin in samples of pharmaceutical formulation	67
Table 3. Accuracy of RP-LC in samples of pharmaceutical formulation	68
Table 4. Responses (percentage of VLG in the commercial tablets relative to its label claimed concentration) obtained in relation to the standard solutions after changes in factors investigated by robustness test.....	69

Capítulo III. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria UV derivada para análise de vildagliptina em comprimidos

Artigo submetido: *UV derivative method for determination of vildagliptin in tablets using an Experimental Design and comparison with HPLC*

Tabela 1. Factors and levels investigated in the robustness test	83
--	----

Tabela 2. Placket-Burman experimental design with the investigated factors	83
Tabela 3. Inter-day and between-analysts precision data for vildagliptin in samples of pharmaceutical formulation obtained by UV derivative method at 220 nm in the the concentration of 100µg/mL.....	88
Tabela 4. Accuracy in samples of pharmaceutical formulation	89
Tabela 5. Responses (percentage of VLG in the commercial tablets relative to its label claimed concentration) obtained, in each assay, in relation to the standard solutions after changes in factors investigated by robustness test	89
Tabela 6. Experimental values of the effects and t-calculated of the factors analyzed	90
Tabela 7. Results obtained in the comparison of HPLC and UV derivative methods..	91

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	7
1. Diabetes Melitus	9
2. Fármacos Hipoglicemiantes	12
2.1. Vildagliptina	16
3. Mecanismo de ação	18
4. Validação de métodos analíticos	19
5. Estabilidade de fármacos e medicamentos	21
6. Referências	23
CAPÍTULO I. Caracterização e identificação de vildagliptina	31
1. Introdução	33
2. Material de Referência.....	34
2.1. Caracterização e identificação de vildagliptina	34
2.1.1 Análise qualitativa	35
<i>Solubilidade</i>	35
<i>Ponto de fusão</i>	36
<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	37
<i>Espectrometria na região do infravermelho (IV)</i>	38
<i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	39
2.2 Produto farmacêutico.....	41
<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	41
<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</i>	43
<i>Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)</i>	45
3. Conclusão	46
4. Referências	48
CAPÍTULO II. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV para análise de vildagliptina em comprimidos e estudo de estabilidade.....	49
Manuscrito submetido ao <i>Journal of Chromatographic Science</i>.....	51
Abstract	52
Introduction.....	53
Experimental	54

Materials and reagents	54
Apparatus and analytical conditions	54
Solutions.....	55
Method validation	56
Results and Discussion	60
Selection and optimization of the chromatographic conditions	60
Method validation	62
Conclusion	71
References	72
CAPÍTULO III. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria UV derivada para a análise de vildagliptina em comprimidos	75
Manuscrito submetido ao <i>Current Pharmaceutical Analysis</i>	77
Abstract	78
Introduction.....	79
Experimental	80
Samples	80
Instrumentation and conditions.....	80
Preparation of reference standard and sample solutions.....	81
Procedure.....	81
Method validation	82
Results and Discussion	85
Selection and optimization of the espechtophotometric conditions	85
Method validation	87
Comparison between HPLC method and UV derivative spectrophotometric method	90
Conclusion	91
References	92
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	93
PERSPECTIVAS.....	97

Diabetes *Mellitus* (DM) se caracteriza por ser um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia pode ser o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

A hiperglicemia é um efeito comum da diabetes descompensada e, a longo prazo, leva a sérios danos no organismo, especialmente aos nervos e aos vasos sanguíneos (JONES *et al.*, 2009).

Uma elevada porcentagem dos pacientes com Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM-2) apresentam excesso de peso ou obesidade no momento do diagnóstico e necessitarão de terapêutica farmacológica para atingir e manter o controle metabólico, apesar de uma alimentação adequada e da prática regular de atividades físicas (GALLEGO, 2005).

Antes do ano de 2000, a escolha de agentes para o tratamento farmacológico da DM-2, especialmente agentes orais, era limitado. Sulfoniluréias e metformina são muito eficazes e ainda estão sendo utilizadas regularmente na prática clínica. No entanto, as sulfoniluréias possuem desvantagens, como aumento de peso e hipoglicemia enquanto que a metformina é frequentemente utilizada para pacientes com sobrepeso pela capacidade de manter o peso inalterado durante o tratamento (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

Os inibidores da dipeptidilpeptidase-4 (DPP-4) representam uma nova classe de agentes antidiabéticos para o tratamento da DM-2, que melhoram o controle glicêmico impedindo a degradação do peptídeo-1, semelhante ao glucagon (GLP-1), e do peptídeo insulínico, dependente de glicose (GIP). Estes peptídeos intestinais, também conhecidos como incretinas, são liberados pelo intestino ao longo do dia e seus níveis aumentam em resposta a uma refeição (JOST *et al.*, 2009).

Um novo rumo para o tratamento da DM-2 consiste em potencializar as ações dos hormônios chamados de incretinas, como o GLP-1 e o GIP. Uma recente estratégia utilizada para melhorar a atividade das incretinas tem sido o desenvolvimento de inibidores da enzima DPP-4 (RISTIC *et al.*, 2005).

A vildagliptina é um potente e seletivo inibidor da DPP-4 que ajuda no controle glicêmico de pacientes com DM-2. Foi aprovada na Europa pela European Medicines Agency (EMA) em 26 de setembro de 2007 para o tratamento de Diabetes *Mellitus* tipo 2 como terapia complementar à metformina, sulfoniluréia ou tiazolidinadiona (BOLLI *et al.*, 2009).

Comercialmente, o fármaco é encontrado no mercado brasileiro na forma farmacêutica de comprimidos contendo 50mg de vildagliptina, com o nome comercial de Galvus[®], marca da Novartis.

Apesar de sua utilização, não existe descrição de metodologia analítica indicativa de estabilidade para a forma farmacêutica objetivando quantificar o fármaco na presença dos excipientes e de seus produtos de degradação e nenhum estudo das características relativas à estabilidade da substância.

Dessa forma, existe a necessidade de um controle de qualidade que seja efetivo para garantir e assegurar sua eficácia representando, assim, uma considerável contribuição à população que faz uso da vildagliptina para o tratamento da DM-2.

Considerando o exposto, o objetivo geral desta dissertação foi desenvolver e validar métodos analíticos para caracterização e determinação quantitativa de vildagliptina em comprimidos e realizar estudo preliminar de estabilidade em condições forçadas de luz, temperatura, hidrólise e oxidação.

Como objetivos específicos foram estipulados:

- Caracterizar a SQR por espectrofotometria na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ¹H) e análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC);
- Identificar a SQR por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);

- Desenvolver e validar métodos quantitativos para análise da vildagliptina em comprimidos e SQR por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do UV;
- Realizar estudos preliminares de estabilidade, identificando os principais fatores extrínsecos que promovem a degradação da vildagliptina na SQR e na forma farmacêutica comprimido, assim como, suas respectivas cinéticas de degradação;
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos.

1. Diabetes Mellitus

Diabetes é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não pode utilizar eficazmente a insulina que produz (JONES *et al.*, 2009).

Considerada uma doença crônica de etiologia múltipla que altera a qualidade de vida dos indivíduos afetados e envolve inúmeros defeitos fisiopatológicos. Dentre eles, está o comprometimento da função das ilhotas e da resistência à insulina que resultam em intolerância à glicose e produção inadequada da glicose hepática em jejum (SRINIVASAN *et al.*, 2008; HALIMI *et al.*, 2008).

Enquanto que a resistência à insulina permanece praticamente inalterada ao longo do tempo, a deficiência da função das ilhotas é um processo progressivo, com alterações quantitativas e qualitativas na cinética de secreção de insulina e glucagon, acompanhada de redução substancial na capacidade máxima de secretar insulina (HALIMI *et al.*, 2008).

A DM-2 causa cerca de 5% de todas as mortes a cada ano no mundo (JONES *et al.*, 2009). Essa patologia constitui grave problema de saúde pública devido a sua alta frequência na população, suas complicações, mortalidade e altos custos financeiros e sociais envolvidos no tratamento (PÉRES *et al.*, 2006).

Em 1995, havia 135 milhões de pessoas com Diabetes Mellitus no mundo e as projeções são de que em 2025, esse número alcance 300 milhões. Cerca de 2/3 desses diabéticos (grande parte portadores da DM-2) vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade. Os 10 países em que se estima ter o maior número de pessoas com diabetes em 2000 e 2030 estão listados na Tabela 1 (WILD *et al.*, 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

Tabela 1. Lista de países com os maiores números de casos estimados de diabetes para 2000 e 2030.

Posição	2000		2030	
	País	Pessoas com diabetes (milhões)	País	Pessoas com diabetes (milhões)
1	Índia	31,7	Índia	79,4
2	China	20,8	China	42,3
3	EUA	17,7	EUA	30,3
4	Indonésia	8,4	Indonésia	21,3
5	Japão	6,8	Paquistão	13,9
6	Paquistão	5,2	Brasil	11,3
7	Federação Russa	4,6	Bangladesh	11,1
8	Brasil	4,6	Japão	8,9
9	Itália	4,3	Filipinas	7,8
10	Bangladesh	3,2	Egito	6,7

*Fonte: WILD *et al.*, 2004

No nosso país, o único estudo de prevalência, realizado no final dos anos 80, demonstrou uma prevalência de diabetes na população de 30 a 69 anos de 7,6%. É importante ressaltar que quase 50% desses indivíduos diagnosticados não sabiam da sua condição (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000).

Possivelmente, após 25 anos, com o envelhecimento da população, o aumento na prevalência de obesidade e do sedentarismo, o número real de diabéticos no Brasil deve estar subestimado e um novo estudo de prevalência se faça necessário (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000).

A classificação atual da DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento e inclui 4 classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional (Tabela 2) (ADA, 1998; WHO, 1999).

O manejo da DM se torna cada vez mais difícil, uma vez que a doença progride. Os pacientes geralmente possuem múltiplas comorbidades que exigem tratamento farmacológico (FONSECA *et al.*, 2007).

Tabela 2. Classificação etiológica da DM

Tipo de diabetes	Caracterização
Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1	Destruição das células β do pâncreas que leva a uma deficiência total da secreção da insulina. Relativa a causas auto-imunes ou idiopáticas
Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	É uma entidade heterogênea caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina. Corresponde à cerca de 90% dos casos de diabetes
Outros tipos específicos	Correspondem a defeitos genéticos da célula β e da ação da insulina, processos de doenças que danificam o pâncreas, diabetes relacionado a outras endocrinopatias e os casos decorrentes do uso de medicamentos (indução por drogas ou produtos químicos)
Diabetes gestacional	Tolerância diminuída a carboidratos, em graus variados de intensidade, diagnosticada durante a gestação

*Fonte: GROSS *et al.*, 2002

Cerca de 50% da população com DM-2 não sabe que são portadores da doença, algumas vezes permanecendo não diagnosticados até que se manifestem sinais de complicações (BRASIL, 2006).

Sabe-se que tanto o nível quanto a duração da hiperglicemia na DM-2 estão estreitamente relacionadas com o risco de desenvolver complicações diabéticas (STRATTON *et al.*, 2000). Portanto, alcançar o controle glicêmico é um pré-requisito para a prevenção de complicações cardiovasculares e microvasculares. Modificações no estilo de vida, incluindo ajustes na dieta e aumento da atividade física, são pilares do tratamento. Para a maioria dos pacientes, entretanto, é necessária a intervenção farmacológica (AHRÉN, 2008).

O controle glicêmico, alcançado pela utilização adequada da insulina e dos agentes hipoglicemiantes disponíveis é o modo mais importante de se retardar ou inibir o desenvolvimento de complicações diabéticas crônicas. As pesquisas têm, portanto, investigado novos agentes terapêuticos que podem, de maneira eficaz, controlar os níveis de glicose sanguíneos (DOUPIS e VEVES, 2008). Diante disso, a indústria farmacêutica tem buscado mais moléculas promissoras com potencial hipoglicemiante para o tratamento da DM-2.

2. Fármacos Hipoglicemiantes

Os agentes hipoglicemiantes orais atuam por diferentes mecanismos de ação: (1) aumento do suprimento insulínico, os chamados secretagogos de insulina (sulfoniluréias e análogos da meglitinida); (2) aumento da ação insulínica, também conhecidos como sensibilizadores da insulina (biguanidas, tiazolidinadionas) e (3) inibidores da absorção rápida de carboidratos, pois atuam retardando a sua absorção (inibidores da α -glicosidase) (MARCONDES, 2003).

As sulfoniluréias são derivadas das sulfonamidas, mas, não apresentam atividade antibacteriana. Estimulam a liberação da insulina pelas células beta do pâncreas, reduzem os níveis sanguíneos do glucágon, e, aumentam a ligação da insulina com os tecidos-alvos e os receptores. Atuam principalmente nos receptores da membrana plasmática das células beta do pâncreas, sobre os canais de potássio sensíveis ao ATP, reduzindo a permeabilidade destas células ao potássio, causando a despolarização e a entrada de cálcio ionizado, e, portanto, aumentando a secreção da insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000). Constituem as sulfoniluréias de primeira geração a clorpropamida, tolazamida e a tolbutamida. As sulfoniluréias de segunda geração correspondem a glibenclamida, glipizida, gliclazida, glimepirida e fenformina. As sulfoniluréias estão associadas com hipoglicemia e ganho de peso. Os efeitos colaterais com esta classe de medicamentos são raros, porém, as hipoglicemias são o maior risco na sua utilização, razão pela qual todos os diabéticos medicados devem ser educados a reconhecer os seus próprios sintomas e a tratar a hipoglicemia (GALLEGO, 2005; SRINIVASAN *et al.*, 2008).

Os análogos da meglitinida (repaglinida e nateglinida) estimulam a liberação da insulina e são rapidamente absorvidos e eliminados causando uma elevação mais rápida e menos duradoura da insulina, razão pela qual devem ser tomados com as refeições principais. Os efeitos adversos são semelhantes aos da sulfoniluréias (ganho de peso e hipoglicemia) (MARCONDES, 2003).

As biguanidas (fenformina, buformina, metformina), usadas desde os anos 50, foram progressivamente retiradas do mercado, nos anos 70, por aumento do risco de lactoacidose, restando atualmente apenas a metformina. A metformina é uma biguanida hidrofílica estável que aumenta a sensibilidade da insulina nos tecidos

periféricos, principalmente no fígado. A redução da glicemia provocada pela metformina se deve especialmente à diminuição da produção hepática de glicose (WANG, *et al.*, 2004). O efeito colateral mais importante é gastrointestinal, com flatulência e diarreia ocorrendo em 20% a 40% dos usuários sendo, em geral, transitório. Para minimizar esse efeito deve ser introduzida gradualmente e administrada durante as refeições. Este fármaco não está associado ao ganho de peso como ocorrido nas outras classes de fármacos hipoglicemiantes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000; MARCONDES, 2003; GALLEG0, 2005).

As tiazolidinonas reduzem a resistência insulínica pela sensibilização do músculo, fígado e tecido adiposo favorecendo, assim, o consumo de glicose pelos tecidos periféricos (KAHN *et al.*, 2006). Atuam como ligantes do receptor gama nuclear ativador do peroxissoma proliferativo (PPAR γ) que está diretamente envolvido na regulação dos genes que controlam a homeostase da glicose e do metabolismo de lipídios (LEBOVITZ *et al.*, 2001). A troglitazona foi o primeiro fármaco desta classe aprovado para o tratamento da DM-2, porém a constatação de hepatotoxicidade e a morte de alguns pacientes ocasionaram a retirada deste fármaco do mercado no ano de 2000. Atualmente são comercializadas mundialmente a rosiglitazona e a pioglitazona, ambas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) (OVALLE *et al.*, 2002). Porém, recentemente, foi constatada a existência de eventos cardiovasculares decorrentes do uso de rosiglitazona (NISSEN e WOLSKI, 2007; NISSEN e WOLSKI, 2010). Sendo assim, a European Medicines Agency (EMA) decidiu proibir a venda do medicamento (EMA, 2010). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cancelou o registro dos medicamentos contendo rosiglitazona como princípio ativo além de autorizar o seu recolhimento no país de acordo com a Resolução Específica nº 1466/2010 (BRASIL, 2010). Já o FDA, passou a restringir a venda do medicamento nos Estados Unidos, mas novos pacientes podem receber a receita deste medicamento se o médico não conseguir o controle da glicose com outros agentes hipoglicemiantes (FDA, 2010).

A acarbose é um inibidor da α -glicosidase disponível desde a década de 1990. Inibe as enzimas gastrintestinais necessárias para a absorção dos carboidratos e é dessa forma, administrada juntamente com as refeições (SRINIVASAN *et al.*, 2008). Uma vez que os carboidratos são absorvidos mais

lentamente, ocorre uma diminuição da elevação da glicemia pós-prandial sem aumento concomitante da concentração de insulina. Seu efeito sobre a glicemia pós-prandial é maior quando utilizada em associação com outros fármacos, como metformina e sulfoniluréias (MARCONDES, 2003). É considerada uma opção terapêutica segura para idosos, já que não são descritas interações medicamentosas com outros fármacos frequentemente empregados por esta população (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000).

Além dessas classes de hipoglicemiantes orais, surgiu uma nova classe de agentes, utilizados para o controle da DM-2, chamados de estimuladores de incretinas ou inibidores da DPP-4.

No período de 2006 a 2007, um princípio totalmente novo na terapêutica para o tratamento da DM-2 foi introduzido no mercado dos EUA e da Europa: as terapias baseadas em incretinas. Estes tratamentos são divididos em dois grupos: os miméticos das incretinas (exenatida e liraglutida), que são preparações injetáveis de peptídeos com ações semelhantes às das incretinas naturais, e os potenciadores das incretinas (sitagliptina e vildagliptina), que estão disponíveis para a via oral inibindo a degradação das incretinas e, conseqüentemente, aumentando suas concentrações plasmáticas e suas ações biológicas. Os dois tipos de tratamentos têm sido bem sucedidos comercialmente, com milhões de prescrições já emitidas (HOLST *et al.*, 2008).

A constatação de que a enzima DPP-4 degrada quase todas as moléculas de GLP-1 de forma extremamente rápida deu origem à proposta de que os inibidores da DPP-4 também podem ser usados como terapia para a DM-2 protegendo e, assim, melhorando a circulação de GLP-1 tornando-se uma estratégia terapêutica atraente (Figura 1).

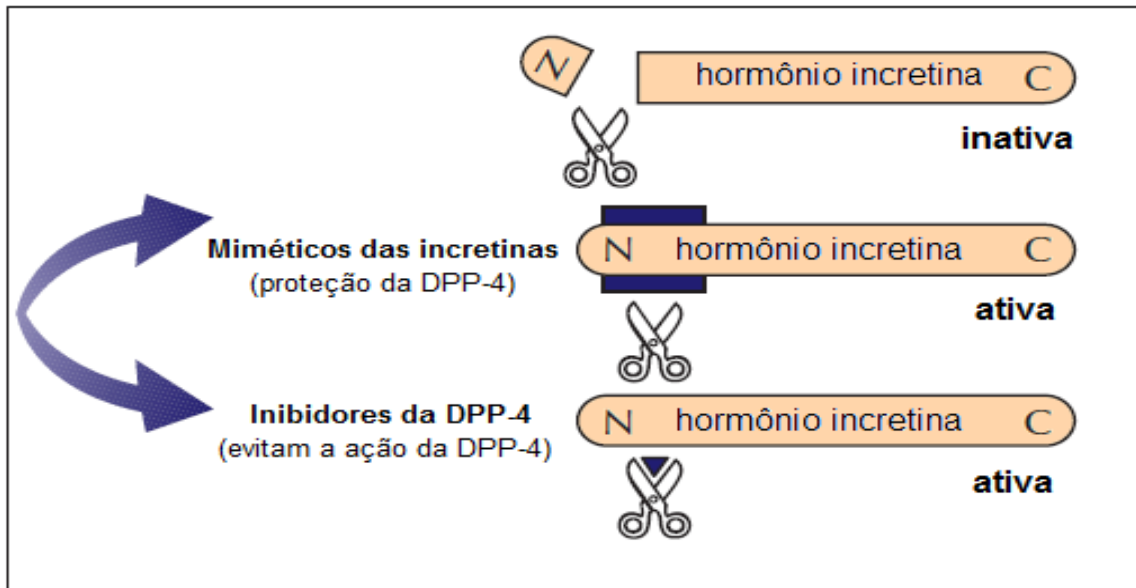


Figura 1. Estratégias para desbloquear o potencial terapêutico das incretinas hormonais. Adaptado de GREEN *et al.*, 2006.

Experimentos recentes documentam que a administração de um já existente inibidor da DPP-4 para suínos protegia tanto a GLP-1 endógena quanto a GLP-1 exógena e isso resultou em aumento da resposta da insulina à glicose (DEACON *et al.*, 1998).

Em um estudo posterior, também em suínos, a inibição da DPP-4 também demonstrou proteger a GIP da degradação resultando, mais uma vez, em aumento da atividade insulínica (DEACON *et al.*, 2001).

Dessa forma, os inibidores da DPP-4 poderiam ser usados como tratamento na primeira etapa da DM-2 (juntamente com alterações na dieta e prática de exercícios físicos) ou para tratamento complementar em combinação com metformina ou a classe das tiazolidinonas quando um único agente não fornece um controle glicêmico adequado. Sua utilização também pode ser expandida como uma terapia combinada com o uso de sulfonilurêias ou insulina (DOUPIS e VEVES, 2008).

A idéia da inibição da DPP-4 como um tratamento para DM-2 foi rapidamente aceita pela indústria farmacêutica, e inúmeras empresas investiram no desenvolvimento de inibidores da DPP-4 para o uso clínico (HOLST *et al.*, 2008).

2.1. Vildagliptina

A vildagliptina possui um baixo risco de causar hipoglicemia, mantém o peso normal e, em geral, é bem tolerada. A adição de vildagliptina amplia a gama de opções de tratamento disponíveis e, como tal, oferece maior potencial para o manejo de pacientes com DM-2 que não são adequadamente controlados em monoterapia utilizando outros fármacos (CROXTALL & KEAM, 2008).

A vildagliptina é indicada na União Européia e em outras partes do mundo para o controle da DM-2 em combinação com metformina, sulfoniluréia ou tiazolidinadiona em pacientes com controle glicêmico inadequado pela utilização de monoterapia. Já está disponível, no mercado, em combinação com metfomina (CROXTALL e KEAM, 2008).

Vildagliptina (Figura 2) possui o nome químico, segundo nomenclatura da IUPAC, de (S)-1-[N-(3-hidroxi-1-adamantil) glicil] pirrolidina-2-carbonitrila. É um pó cristalino branco a levemente amarelado, não-higroscópico, facilmente solúvel em água e solventes orgânicos polares e não possui polimorfos ou solvatos identificados. Essa substância possui somente um centro quiral e é comercializada na forma de enantiômero puro (S) (EMEA, 2007).

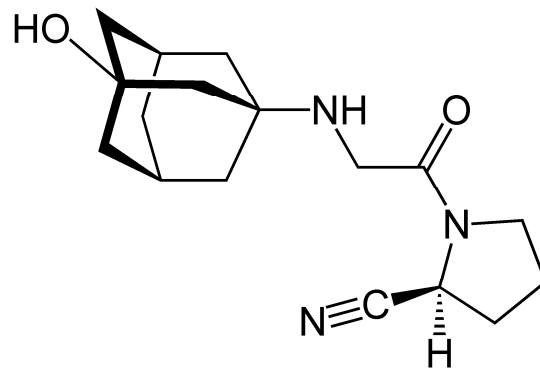


Figura 2. Estrutura química da vildagliptina

O fármaco é rapidamente absorvido após administração oral, atingindo picos de concentração plasmáticos de 1,5 a 1,7 horas após a administração. As

concentrações plasmáticas aumentam proporcionalmente à dose. A exposição sistêmica à vildagliptina não é afetada pela ingestão de alimentos sendo esta amplamente distribuída. É predominantemente metabolizada pelos rins, em metabólitos inativos e cianoamida, e aproximadamente 85% é eliminado na urina, com meia-vida de eliminação de, aproximadamente, três horas após a administração oral (CROXTALL e KEAM, 2008).

PI-SUNYER e colaboradores (2007) relataram resultados com vildagliptina utilizada em monoterapia comparando-se com placebo. Os testes foram realizados no período de 18 a 24 semanas e todos os pacientes mostraram redução significativa dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) entre 0,48% a 0,84% acompanhados de perda de peso ou nenhuma mudança de peso.

SCHWEIZER e colaboradores (2007) realizaram um estudo da ação da vildagliptina quando comparada à metformina e observaram redução dos níveis de HbA1c nos pacientes estudados.

Alguns estudos, como os de AHREN e colaboradores (2004) e BOSI e colaboradores (2007), examinaram os efeitos da vildagliptina quanto utilizada em associação com metformina. Os pesquisadores compararam os efeitos da vildagliptina e metformina com o placebo e metformina. Os resultados mostraram redução nos níveis de HbA1c utilizando ambos os fármacos em associação com perda ou neutralidade de peso.

A associação de cloridrato de metformina, que aumenta a absorção de glicose nos tecidos periféricos e reduz a gliconeogênese hepática, com vildagliptina oferece abordagem terapêutica racional para o tratamento da DM-2 (YARDIMNCI e O'ZALTIN, 2005; HENNESS e KEAM, 2006), ou seja, não aumenta o risco de hipoglicemia e não promove ganho de peso, um dos efeitos adversos comuns em outras combinações de antidiabéticos orais (GALLWITZ, 2007).

GARBER e colaboradores (2007) e ROSENSTOCK e colaboradores (2007) também demonstraram redução dos níveis de HbA1c acompanhada de perda de peso, quando da utilização de vildagliptina em associação com sulfoniluréias e com rosiglitazona, respectivamente.

No que se refere à análise qualitativa e quantitativa não existe literatura disponível para a vildagliptina em comprimidos.

3. Mecanismo de ação

A vildagliptina é um rápido e seletivo inibidor da DPP-4, enzima que é responsável pela inativação das incretinas hormonais GLP-1 e GIP, que desempenham papel fundamental na manutenção da homeostase da glicose. O fármaco melhora a hiperglicemia principalmente, prolongando a meia-vida de GLP-1 e GIP e reforçando, assim, sua ação sobre as células da ilhota, promovendo a secreção de insulina dependente de glicose e suprimindo a secreção inadequada de glucágon. Além disso, parece atenuar o declínio da função das células β dependentes de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina aumentando, também, a sensibilidade das células α para glicose (CROXTALL e KEAM, 2008).

O hormônio incretina predominante é o GLP-1 que se liga aos seus receptores, na superfície das células β . Os receptores são conectados a uma via de transdução de sinais que, quando ativa, resulta no aumento da biossíntese e da secreção de insulina aumentando, dessa forma, a função da ilhota. Além de aumentar a secreção de insulina, o GLP-1 tem efeitos sobre a secreção de glucágon e o esvaziamento gástrico (DOUPIS & VEVES, 2008). Esses efeitos estão representados na Figura 3.

Em decorrência dessas atividades, os níveis glicêmicos caem e o meio metabólico melhora. A abordagem terapêutica é sustentada por duas observações: pacientes com DM-2 possuem níveis de GLP-1 reduzidos e a administração de um inibidor da DPP-4 melhora a glicemia pelo aumento da meia-vida do GLP-1. Cabe ressaltar que os agentes terapêuticos clássicos utilizados no tratamento da DM-2 não ativam essas vias (FORTI, 2006).

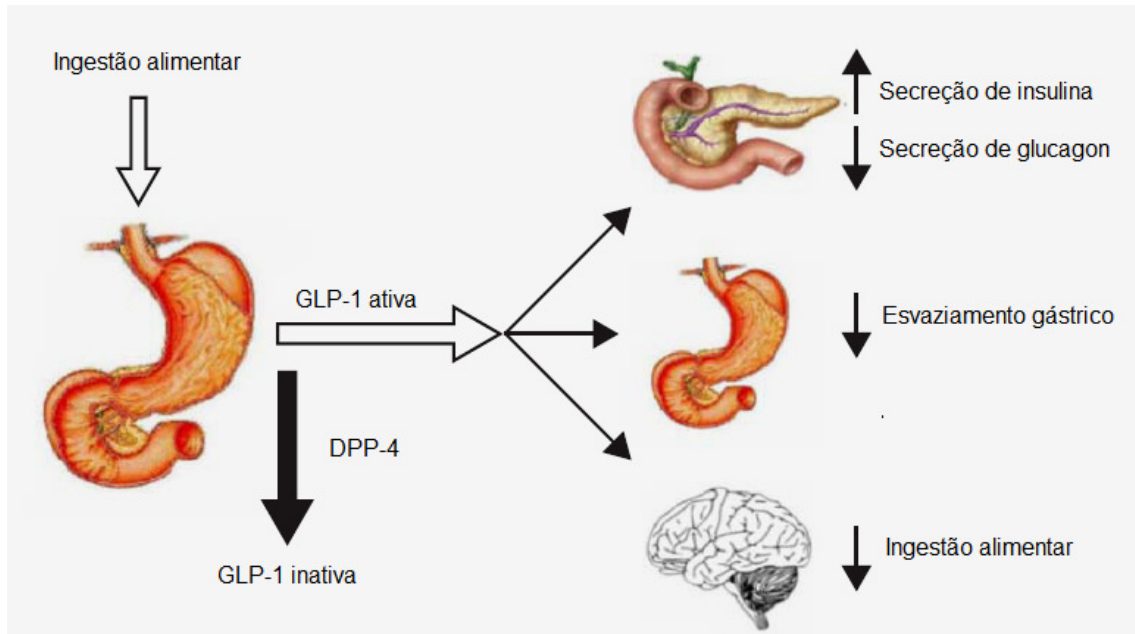


Figura 3. Metabolismo do GLP-1 e seus efeitos no estado pós-prandial (Adaptado de DOUPIS e VEVES, 2008).

4. Validação de métodos analíticos

A demonstração da capacidade de um método analítico para quantificação é de grande importância para garantir a qualidade, a segurança e a eficácia de produtos farmacêuticos. Conseqüentemente, antes de um método analítico ser implementado na análise de rotina, primeiramente deve ser validado, de forma a demonstrar que é adequado para a finalidade pretendida (ROZET *et al.*, 2007).

A validação é um processo pelo qual se estabelece, por meio de estudos experimentais, que um método é apropriado para as aplicações analíticas pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Sendo assim, um método analítico validado fornece garantia de confiabilidade e pode ser denominado também como "o processo de prestação de provas documentais que aborda o que o método faz e o que se pretende fazer" (SHABIR, 2003).

Métodos analíticos confiáveis são a base para a obtenção de dados de elevada qualidade. Dessa forma, a qualidade de um método analítico depende, em grande

parte, do seu desenvolvimento e complementarmente da sua validação. Diante disso, somente a validação pode demonstrar a qualidade inerente da metodologia analítica mediante o cumprimento dos critérios mínimos de aceitação e, então, provar sua aplicabilidade para uma determinada proposta (PETERS *et al.*, 2007).

Para que um estudo de validação seja conduzido com sucesso, é necessário que se tenha amplo conhecimento da legislação, referente aos fármacos em estudo, e das diretrizes propostas pelas agências reguladoras que atuam na área em questão juntamente com um bom planejamento do método a ser desenvolvido assim como a técnica adotada e a finalidade do método (RIBANI *et al.*, 2004).

As agências reguladoras do Brasil e de outros países exigem a validação de métodos analíticos para o registro de novos produtos e, para isso, a maioria delas estabeleceu guias e resoluções com diretrizes a serem adotadas no processo. No Brasil, a validação de métodos analíticos é regulamentada por uma resolução (BRASIL, 2003) com poder de lei. As guias, em contrapartida, são documentos que recomendam uma linha a ser seguida, e são, portanto, flexíveis para permitir que os analistas possam adaptá-las de acordo com a situação (RIBANI *et al.*, 2004).

Em 1990, a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) foi criada como um projeto único para reunir as entidades reguladoras da Europa, Japão e Estados Unidos com o objetivo de alcançar maior harmonização dos parâmetros, requisitos e, também, da metodologia para a validação de método analítico. Os principais critérios definidos para avaliar métodos analíticos, pela ICH e pelas agências reguladoras ao redor do mundo, são: seletividade/especificidade, exatidão, precisão, faixa de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (ICH, 2005; ARAUJO, 2009).

As diretrizes contidas nas guias publicadas pela ICH são quase integralmente adotadas na Farmacopéia Americana (USP 32, 2009) e no texto da Resolução Específica nº 899/2003 (BRASIL, 2003).

Os métodos analíticos são divididos, de acordo com a sua aplicação, em quatro categorias as quais englobam testes quantitativos para determinação da substância ativa em medicamentos ou matéria-prima (categoria I), testes quantitativos para a determinação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos ou matéria-prima (categoria II), testes quantitativos para

determinação de características de desempenho do medicamento (categoria III) e testes de identificação (categoria IV) (BRASIL, 2003; USP 32, 2009).

De acordo com a categoria é exigida a avaliação de alguns parâmetros analíticos conforme a finalidade dos testes aplicados. Para os ensaios da categoria I são requeridos especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Para a categoria II, se o ensaio for quantitativo, devem ser avaliados todos os parâmetros acima citados juntamente com o limite de quantificação e, se for ensaio limite para impurezas, só é necessário realizar especificidade, limite de detecção e robustez. O exigido, para a categoria III, é o ensaio de precisão. Já, para a categoria IV, o parâmetro fundamental a ser avaliado é a especificidade (BRASIL, 2003; USP 32, 2009).

5. Estabilidade de fármacos e medicamentos

Embora classicamente a estabilidade de um medicamento se refira à capacidade que um fármaco ou substância química tem para suportar a perda devido à decomposição, no mundo farmacêutico, o termo "estabilidade" mais frequentemente se refere ao tempo de armazenamento permitido antes que qualquer produto de degradação atinja na forma farmacêutica um nível suficiente que possa representar um risco para o paciente (WATERMAN e ADAMI, 2005).

As indústrias farmacêuticas realizam estudos de degradação forçada durante a etapa de pré-formulação para auxiliar na seleção de compostos e excipientes, para facilitar a seleção ou otimização da formulação e para produzir amostras para o desenvolvimento de métodos analíticos indicadores de estabilidade. Os testes de estresse fornecem, também, informações sobre mecanismos e produtos de degradação em potencial. Tais informações são relevantes no desenvolvimento de processos de fabricação e/ou para selecionar materiais de embalagem. Estes estudos também podem ser utilizados no preparo de substâncias de referência ou na elucidação de produtos de degradação (KLICK *et al.*, 2005).

O estudo de estabilidade tem como propósito prover evidência de como a estrutura de um fármaco varia com o tempo, sob influência de uma variedade de fatores, e estabelecer um período de re-teste para a substância ou a vida de

prateleira do produto, recomendando as condições de estocagem (ICH, 2003). Dessa forma, as guias requerem explicitamente que os estudos de degradação forçada sejam conduzidos sob várias condições tais como pH, luz, oxidação, temperatura, etc., bem como do tipo de componente utilizado no recipiente de armazenamento (embalagem) (BAKSHI e SINGH, 2002; USP 32, 2009).

A introdução de novos fármacos no mercado faz com que a realização de estudos de estabilidade seja imprescindível, principalmente com intuito de observar a formação de possíveis produtos de degradação e a concomitante redução do teor da substância em estudo.

A degradação de um fármaco pode ocasionar inúmeras alterações em suas características, com sérias consequências na sua qualidade, tais como redução ou aumento de sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de degradação tóxicos e perda da integridade do recipiente de armazenamento (RHODES, 2000).

Com base nos inúmeros problemas decorrentes da degradação de um medicamento, torna-se importante a avaliação da estabilidade do mesmo, de forma a assegurar a identidade, eficácia, potência, segurança e pureza até o momento do seu uso, estabelecendo as condições mais apropriadas para a sua armazenagem (NUDELMAN, 1975).

A previsão da estabilidade de um produto farmacêutico é realizada através de testes de longa duração e estabilidade acelerada, conforme regulamentado, no Brasil, pela atual RE nº 1 de 29 de julho de 2005 da ANVISA (BRASIL, 2005), a qual é uma adaptação, para nossa zona climática, da guia elaborada pela ICH (ICH, 2003). Levando em consideração que os ensaios de estabilidade são pertinentes à temperatura do país, todos os ensaios devem ser realizados em função dos nossos aspectos climáticos onde ocorre acentuada variação de temperatura e umidade, entre as regiões, durante todo o ano.

Os estudos de estabilidade podem influenciar a especificação, os limites e os métodos para o controle de fármacos (SIMON *et al.*, 2004). E, por isso, os métodos analíticos devem ser empregados corretamente no acompanhamento da estabilidade de medicamentos de forma que o método utilizado esteja validado

adequadamente e não sofra a interferência dos possíveis produtos de degradação quando da determinação do fármaco na sua forma farmacêutica.

6. Referências

ADA. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1998; 21 Suppl 1: S5.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 2224-2234, 2009.

AHREN, B; GOMIS, R; STANDL, E; MILLS, D; SCHWEIZER, A. Twelve- and 52-Week Efficacy of the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor LAF237 in Metformin-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, v. 27, p. 2874-2880, 2004.

AHRÉN, B. Novel combination treatment of type 2 diabetes DPP-4 inhibition + metformin. *Vascular Health and Risk Management*, v. 4, p. 383-394, 2008.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 1011–1040, 2002.

BOLLI, G.; DOTTA, F.; COLIN, L.; MINIC, B.; GOODMAN, M. Comparison of vildagliptin and pioglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 11, p. 589-595, 2009.

BOSI, E; CAMISASCA, RP; COLLOBER, C; ROCHOTTE, E; GARBER, AJ. Effects of Vildagliptin on Glucose Control Over 24 Weeks in Patients With Type 2 Diabetes Inadequately Controlled With Metformin. *Diabetes Care*, v. 30, p. 890-895, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. *Diário Oficial da União*, Brasília, Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. *Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade*. *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.

_____. Ministério da Saúde. Diabetes Mellitus. *Cadernos de atenção básica*. Normas e manuais técnicos. Brasília, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1466, de 31 de março de 2010. *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, de 05 de abril de 2010.

CROXTALL, JD & KEAM, SJ. Vildagliptin A Review of its Use in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*, v. 68, p. 2387-2409, 2008.

DEACON, CF; HUGHES, TE; HOLST, JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes*, v. 47, p. 764-769, 1998.

DEACON, CF; DANIELSEN, P; KLARSKOV, L; OLESEN, M; HOLST, JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition reduces the degradation and clearance of GIP and potentiates its insulinotropic and antihyperglycemic effects in anesthetized pigs. *Diabetes*, v. 50, p. 1588-1597, 2001.

DOUPIS, J.; VEVES, A. DPP4 Inhibitors: a New Approach in Diabetes Treatment. *Advanced Therapies*, v. 25, n. 7, p. 627-643, 2008.

EMA, 2007. Disponível em:
<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000771/WC500020330.pdf> Acesso em 13/10/2010.

EMA, 2010. Disponível em:
<http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/public_health_alerts/2010/09/human_pha_detail_000020.jsp&murl=menus/medicines/medicines.jsp&mid=>> Acesso em 25/10/2010.

FDA, 2010. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm226956.htm>> Acesso em 25/10/2010.

FONSECA, V; SCHWEIZER, A; ALBRECHT, D; BARON, MA; CHANG, I; DEJAGER, S. Addition of vildagliptin to insulin improves glycaemic control in type 2 diabetes. *Diabetologia*, v. 50, p. 1158-1155, 2007.

FORTI, AC. Estratégias terapêuticas baseadas nas vias do GLP-1. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine*, v. 6, p. S618-S626, 2006.

GALLEGO, MR. Terapêutica oral da Diabetes tipo 2. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, v. 21, p. 575-584, 2005.

GALLWITZ, B. Sitagliptin with metformin: Profile of a combination for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Today*, v. 43, n. 10, p. 681, 2007.

GARBER, AJ; CAMISASCA, RP; JAUFFRET, S; BARON, MA. Efficacy and tolerability of vildagliptin added to a sulfonylurea (SU) in patients with type 2 diabetes (T2DM). *Diabetes*, v. 56, 2007.

GREEN, BD; FLATT, PR; BAILEY, CJ. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes and Vascular Disease Research*, v. 3, p. 159-165, 2006.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, p. 16-26, 2002.

HALIMI, S.; SCHWEIZER, A.; MINIC, B.; FOLEY, J.; DEJAGER, S. Combination treatment in the management of type 2 diabetes: focus on vildagliptin and metformin as a single tablet. *Journal of Vascular Health and Risk Management*. v. 4, n. 3, p. 481-492, 2008.

HENNESS, S.; KEAM, S. J. Vildagliptin. *Drugs*, v. 66, n. 15, p. 1989-2001, 2006.

HOLST, JJ; DEACON, CF; VILSBØLL, T; KRARUP, T; MADSBAD, S. Glucagon-like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, v. 14, p. 161-168, 2008.

ICH. International Conference on Harmonisation. *Text on validation of analytical procedures (Q2A)*. Geneva: ICH Secretariat, 1994. p.1-5.

_____. International Conference on Harmonisation. *Text of analytical procedures: methodology (Q2B)*. Geneva: ICH Secretariat, 1996. p.1-8.

_____. International Conference on Harmonisation. *Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A (R2)*. Geneva: ICH Secretariat, 2003.

_____. International Conference on Harmonisation. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*. Geneva: ICH Secretariat, 2005.

JONES, R. M.; LEONARD, J. N.; BUZARD, D. J.; LEHMANN, J. GPR119 agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 19, n. 10, p. 1339-1359, 2009.

JOST M. M.; LAMERZ J.; TAMMEN H.; MENZEL C.; De MEESTER I.; LAMBEIR A. M.; AUGUSTYNS K.; SCHARPE S.; ZUCHT H. D.; ROSE H.; JURGENS M.; SCHULZ-KNAPPE P.; BUDDE P. In vivo profiling of DPP4 inhibitors reveals alterations in collagen metabolism and accumulation of an amyloid peptide in rat plasma. *Biochemical Pharmacology*, v. 77, p. 228-237, 2009.

KAHN, SE; HAFFNER, SM; HEISE, MA; HERMAN, WH; HOLMAN, RR; JONES, NP; KRAVITZ, BG; LACHIN, JM; ZINMAN, B.; VIBERTI, G. Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy. *The New England Journal of Medicine*, v. 355, p. 2427-2443, 2006.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, O.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDIN, T.; DEBETS, A.; CRIEND, C.; BELD, C.; SONSEN, G.; JONG, G. Toward a generic approach for stress testing and drug products. *Pharmaceutical Technology*, V.29, N.2, p. 48-66, 2005.

LEBOVITZ, HE; DOLE, JF; PATWARDHAN, R.; RAPPAPORT, EB; FREED, MI. Rosiglitazone Monotherapy Is Effective in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 86, p. 280-288, 2001.

MARCONDES, JAM. Diabetes melito: fisiopatologia e tratamento. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 5, p. 18-26, 2003.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes. *The New England Journal of Medicine*, v. 356, p. 2457-2471, 2007.

_____. Rosiglitazone Revisited: An Updated Meta-analysis of Risk for Myocardial Infarction and Cardiovascular Mortality. *Archives of Internal Medicine*, v. 170, p. 1191-1201, 2010.

NUDELMAN, N.,S. *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: El Atheneo,1975, p.135.

OVALLE, F.; BIRMINGHAM, A.; OVALLE-BERÚMEN, F. Thiazolidinediones: a review of their benefits and risks. *Southern Medical Journal*, v. 95, 2002.

PÉRES D. S.; IVANEA L. J.; SANTOS M. A.; Comportamento alimentar em mulheres portadoras de diabetes tipo 2. *Revista de saúde pública*, v. 40, n. 2, 2006.

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

PI-SUNYER, FX; SCHWEIZER, A; MILLS, D; DEJAGER, S. Efficacy and tolerability of vildagliptin monotherapy in drug-naive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 76, p. 132-138, 2007.

RHODES, C. T. Introductory overview. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. *Drug Stability: Principles and Practice*. New York: Marcel Dekker, 2000. Cap. 1, p. 1-18.

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

RISTIC. S.; BYIERS, S.; FOLEY, J.; HOLMES, D. Improved glycaemic control with dipeptidyl peptidase-4 inhibition in patients with type 2 diabetes: vildagliptin (LAF237) dose response. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 7, p. 692-698, 2005.

ROSENSTOCK, J; BARON, MA; DEJAGER, S; MILLS, D; SCHWEIZER, A. Comparison of vildagliptin and rosiglitazone monotherapy in patients with type 2 diabetes: a 24-week, double-blind, randomized trial. *Diabetes Care*, v. 30, p. 217-223, 2007.

ROZET, E; CECCATO, A; HUBERT, C; ZIEMONS, Z; OPREAN, R; RUDAZ, S; BOULANGER, B; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 111–125, 2007.

SCHWEIZER, A; COUTURIER, A; FOLEY, JE; DEJAGER, S. Comparison between vildagliptin and metformin to sustain reductions in HbA1c over 1 year in drug-naïve patients with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, v. 24, p. 955-961, 2007.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57–66, 2003.

SIMON, P.; VEVERKA, M.; OKULIAR, J. New screening method for the determination of stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 270, p. 21–26, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e classificação do Diabetes mellitus e tratamento do Diabetes mellitus tipo 2, 2000. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>> Acesso em 13/10/2010.

_____. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus, 2006. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>> Acesso em 13/10/2010.

_____. Os custos do Diabetes Mellitus, 2010. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br>> Acesso em 13/10/2010.

SRINIVASAN, B. T.; JARVIS, J.; KHUNTI, K.; DAVIES, M.J. Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus: a review. *Postgraduate Medical Journal*, v. 84, p. 524-531, 2008.

STRATTON, IM; ADLER, AI; NEIL, HA; MATTHEWS, DR; MANLEY, SE; CULL, CA; HADDEN, D; TURNER, RC; HOLMAN, RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *British Medical Journal*, v. 321, p. 405-412, 2000.

USP 32. *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA*. 32th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

WANG, Y.; TANG, Y.; GU, J.; FAWCETT, JP; BAI, X. Rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 808, p. 215–219, 2004.

WATERMAN, KC; ADAMI, RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 293, p. 101–125, 2005.

WILD, S; ROGLIC, G; GREEN, A; SICREE, R; KING, H. Global prevalence of Diabetes – Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

WHO. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO; 1999.

YARDIMCI, C.; ÖZALTIN, N. Method development and validation for the simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 549, p. 88–95, 2005.

CAPÍTULO I. Caracterização e identificação de vildagliptina

1. Introdução

Os padrões de referência são utilizados para análise qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa. Na indústria farmacêutica, são usados rotineiramente para determinar o teor e a identificação dos medicamentos, insumos farmacêuticos ativos, conservantes, antioxidantes e excipientes. Os padrões de referência também são utilizados em calibração de instrumentos de rotina e de qualificação. É um requisito obrigatório pelas agências reguladoras nacionais de saúde em todo o mundo que os padrões de referência utilizados na indústria farmacêutica devam ser completamente caracterizados e avaliados usando métodos analíticos adequados. (MATHKAR *et al*, 2009).

Sendo assim, torna-se de extrema importância desenvolver métodos analíticos qualitativos os quais possam caracterizar e identificar um padrão de referência para que este seja utilizado posteriormente de forma segura na análise de fármacos presentes em produtos farmacêuticos.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é, frequentemente, a técnica de análise térmica preferida devido à capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. Esta técnica fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos clássicos, ocasionalmente, não permitem, além de fornecer a entalpia de fusão, indicar a pureza de uma amostra, determinando se esta sofreu alguma degradação, decomposição ou conversão polimórfica durante o processo de fusão (CLAS *et al.*, 1999).

A espectrometria no infravermelho (IV) é uma técnica capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais (salvo isômeros ópticos) entre elas. É considerada como um ensaio de identificação por excelência (FARMACOPÉIA, 1988).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica extremamente eficaz para caracterizar exatamente uma estrutura química em matérias-primas e produtos acabados (WATSON, 2005).

Dentre os tipos de cromatografia utilizados em análises qualitativas estão a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CCD é normalmente mais útil para fins de identificação, devido à sua conveniência e simplicidade. Já, a CLAE requer equipamentos mais elaborados, mas geralmente oferece alta resolução e identifica quantidades muito pequenas de material (USP 32, 2009). A CLAE, utilizada na identificação de compostos, realiza a comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução padrão do mesmo fármaco. A utilização de um detector de arranjo de fotodiodos permite, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos.

A identificação de fármacos por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Além disso, verifica-se se os produtos apresentam os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção. Mesmo não sendo um método seletivo, possui ampla aplicação nos Códigos Oficiais (FARMACOPÉIA, 1988).

O objetivo do presente capítulo foi o desenvolvimento de ensaios qualitativos para a análise de vildagliptina utilizada como substância química de referência visando a sua caracterização e identificação de forma a verificar sua adequação para posterior utilização nos estudos propostos por este trabalho.

2. Material de Referência

A vildagliptina, caracterizada macroscopicamente como um pó cristalino branco e inodoro, com pureza de 99,5% e lote número SRP01033v foi adquirida através de importação pela empresa Sequóia Research Products (Reino Unido).

2.1 Caracterização e identificação de vildagliptina

A pureza da substância utilizada como referência é de extrema importância para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Assim sendo, devem ser

utilizados materiais de referência com pureza documentada e bem caracterizados para o estudo de validação (ICH, 2005; MATHKAR *et al*, 2009). Neste contexto, este capítulo enfoca a análise qualitativa da vildagliptina substância química de referência (VLG SQR), incluindo a caracterização da VLG SQR através da determinação da solubilidade, faixa e ponto de fusão, análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria na região do infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) bem como o desenvolvimento de método por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) para identificação de vildagliptina nos comprimidos.

2.1.1 Análise qualitativa

Solubilidade

A determinação da solubilidade da VLG SQR foi realizada para verificar quais solventes poderiam ser utilizados como diluentes nos métodos a serem desenvolvidos. Esta avaliação foi realizada conforme F. Bras. IV, 1988, porém ao invés da pesagem de 1g de fármaco, foram utilizados 10 mg. Os solventes empregados para a verificação da solubilidade foram: metanol, água, acetonitrila, diclorometano, clorofórmio, ácido clorídrico 0,1 M e hidróxido de sódio 0,1 M, mantidos à 25 °C. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico. Cada solvente utilizado e suas respectivas solubilidades observadas podem ser verificadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Solubilidade determinada para VLG SQR de acordo com a F. Bras. IV, 1988

Solvente	Solubilidade
Metanol	Facilmente solúvel
Água	Facilmente solúvel
Acetonitrila	Solúvel
Diclorometano	Facilmente solúvel
Clorofórmio	Facilmente solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Facilmente solúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	Facilmente solúvel

Ponto de fusão

O ponto de fusão para a vildagliptina não é apresentado na literatura disponível. Dessa forma, essa determinação foi realizada para auxiliar na identificação da VLG SQR, já que a análise fornece informações sobre o grau de pureza e, também, sobre a presença de contaminantes através da alteração do valor obtido.

As análises foram realizadas em equipamento para ponto de fusão automático, marca Mettler Toledo, modelo FP 90 Central Processor, com célula Mettler FP 81 HT MBC.

Os valores de ponto de fusão encontrados foram comparados com os obtidos pela técnica de DSC para confirmação do ponto de fusão do fármaco.

Uma pequena quantidade de padrão foi colocada em capilares e, a partir desses, realizaram-se as análises em triplicata de forma a verificar a faixa e o ponto de fusão do fármaco.

Os resultados indicam que o ponto de fusão para vildagliptina foi de 147 °C.

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises foram realizadas em um calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60-A, integrador TA-60WS e software de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Foram pesados aproximadamente 2mg de VLG em porta-amostra de alumínio com capacidade para 4μl, o qual foi selado e inserido no equipamento de DSC. A análise foi efetuada sob atmosfera inerte de nitrogênio mantida sob fluxo de 50 ml/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 170 °C.

Esta técnica compara e avalia diferenças no fluxo de calor entre uma referência (porta-amostra selado vazio) e a substância em análise enquanto ambas são submetidas ao programa de temperatura controlada.

A curva de aquecimento indicou uma temperatura de fusão de 146,5 °C, conforme Figura 1.1. A VLG SQR apresentou transição endotérmica, ou seja, a amostra absorveu calor (80,46 J/g) para fundir.

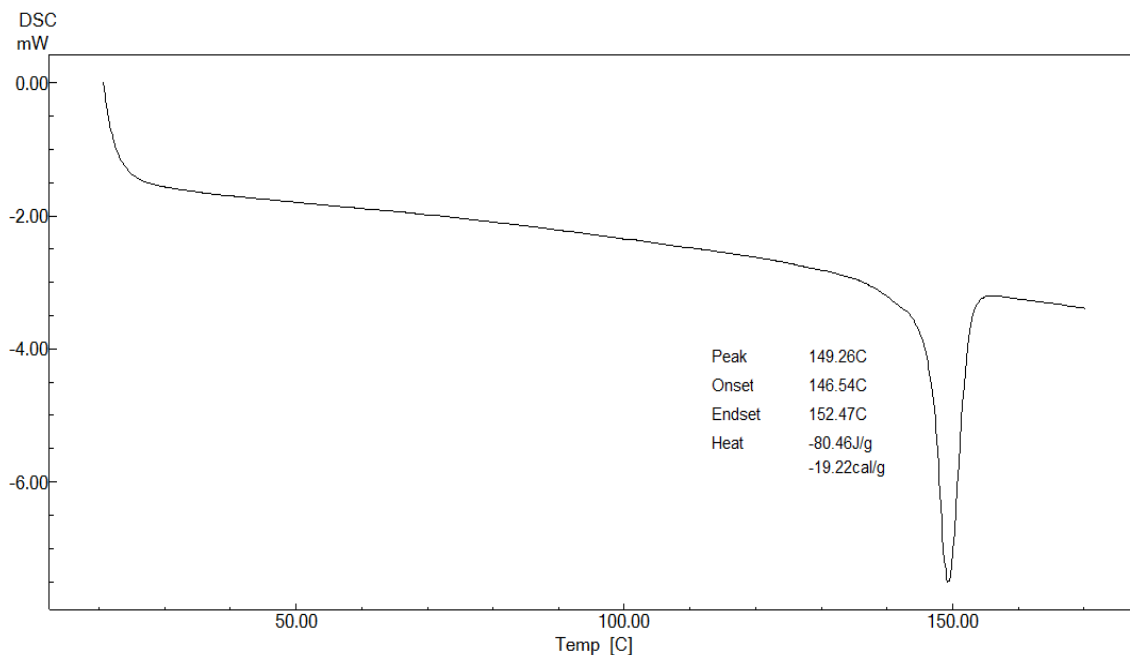


Figura 1.1. Curva de aquecimento de vildagliptina SQR realizada por DSC.

Os valores obtidos na curva de aquecimento de VLG mostram que a DSC é uma técnica adequada como indicadora de identidade e pureza da SQR uma vez que os resultados se equivaleram aos resultados encontrados para o ponto de fusão utilizando o equipamento Mettler Toledo.

Espectrofotometria na Região do Infravermelho (IV)

O espectro na região do infravermelho da VLG SQR foi obtido através da pesagem de, aproximadamente, 1mg de VLG. A análise foi realizada em espectrofotômetro FT-IR, Spectrum BX, marca Perkin Elmer. O espectro no infravermelho da VLG pode ser observado na Figura 1.2. Na Tabela 1.2 estão descritas as atribuições para as principais bandas referentes aos grupos funcionais característicos da molécula

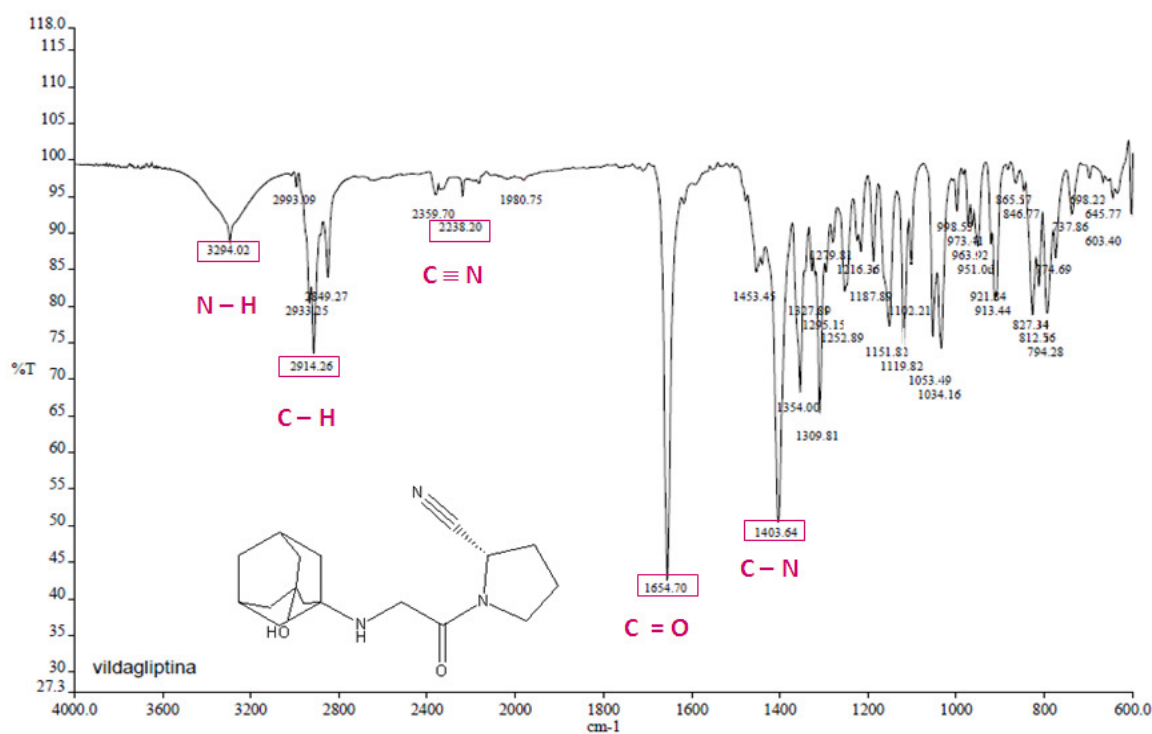


Figura 1.2. Espectro de infravermelho da vildagliptina SQR.

Tabela 1.2. Atribuição das principais bandas do espectro da vildagliptina na região do IV

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
1403	Banda de estiramento ligação C-N
1654	Banda referente à ligação C=O
2238	Banda de deformação C≡N
2914	Deformação da ligação C-H alifática
3294	Banda referente à deformação N-H

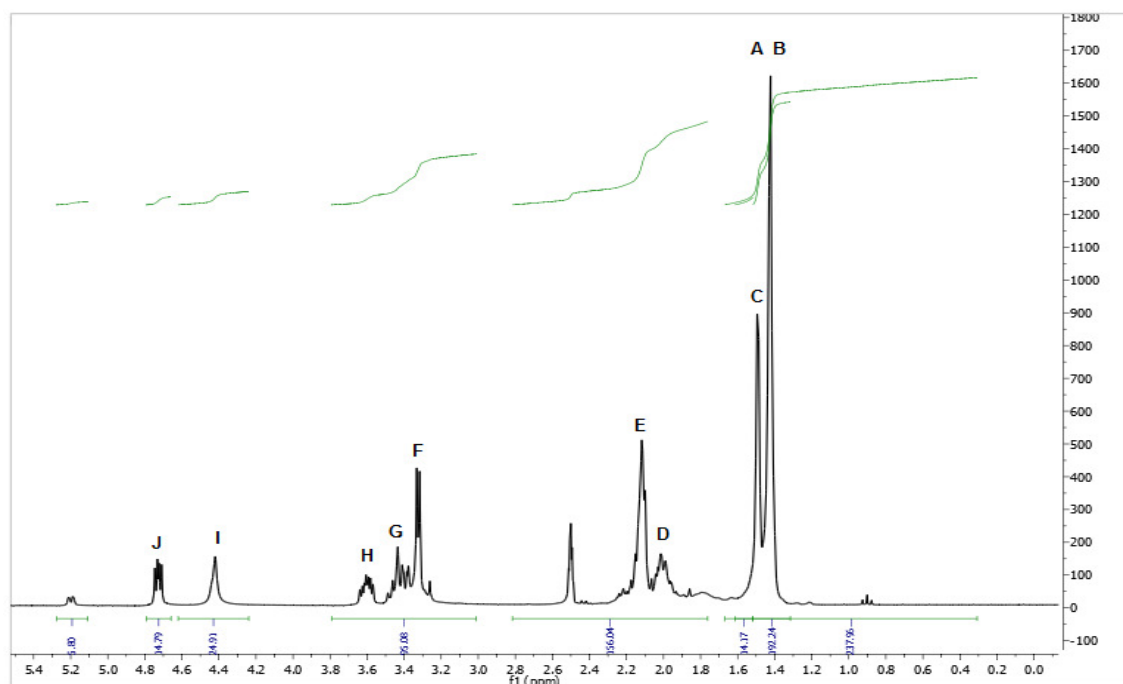
A interpretação do espectro de IV da VLG foi analisada conforme SILVERSTEIN e colaboradores (2005). A presença da banda em 1654 cm⁻¹ (uma das bandas mais fortes do espectro) indica a presença de carbonila devido ao grande momento dipolar apresentado por esse grupamento.

A análise por espectrofotometria no infravermelho é um indicativo de que a amostra seja vildagliptina já que as bandas encontradas no espectro da substância estão de acordo com os grupamentos presentes na molécula de vildagliptina.

Cabe ressaltar que o conhecimento do espectro de IV dessa substância é importante no sentido de caracterizá-la uma vez que, em estudos de degradação forçada, pode ocorrer a formação de produtos de degradação que modificam sinais característicos de grupos funcionais da estrutura da molécula.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de RMN ¹H da VLG SQR foi realizado em equipamento Varian, modelo VNMRS-300 de 300 MHz, utilizando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO_{d6}) como solvente. O espectro de RMN ¹H da VLG SQR está apresentado na Figura 1.3.


 Figura 1.3. Espectro de RMN ^1H em DMSO_{d6} da vildagliptina SQR

As atribuições do espectro de RMN ^1H , bem como a estrutura química da vildagliptina indicando essas atribuições, estão apresentadas na Tabela 1.3 e na Figura 1.4, respectivamente.

 Tabela 1.3. Atribuições do espectro de RMN ^1H da vildagliptina em DMSO_{d6}

Hidrogênio	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade	Número de hidrogênios	Interpretação
A, A' e A''	1,42	duplete	6	3CH ₂
B, B' e B''	1,43	duplete	6	3CH ₂
C e C'	1,49	simpleto	2	2CH
D	2,00	multipleto	1	OH
E	2,15	multipleto	2	CH ₂
-	2,50	multipleto	-	Solvente (DMSO_{d6})
F	3,25	duplete	2	CH ₂
G	3,44	multipleto	2	CH ₂
H	3,64	multipleto	2	CH ₂
I	4,42	simpleto	1	NH-R
J	4,73	duplo duplete	1	CH

* Fonte: PAVIA *et al.*, 2001

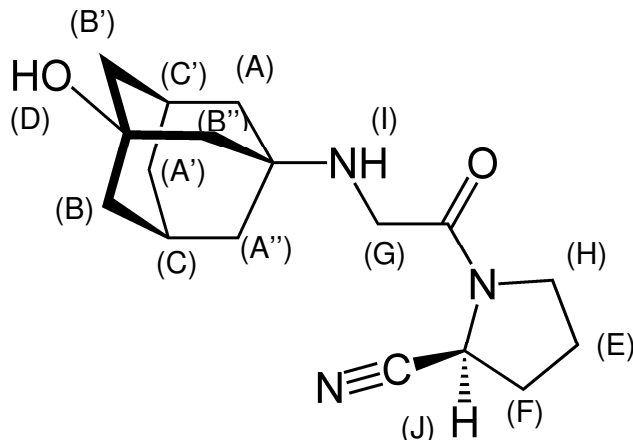


Figura 1.4. Estrutura química de VLG e respectivas atribuições do espectro de RMN ^1H em DMSO_{d6} .

2.2. Produto farmacêutico

Os comprimidos de Galvus[®] foram adquiridos no comércio local, pois se encontram disponíveis no Brasil. Sua produção é realizada pela indústria farmacêutica Novartis Biociências S.A. Os excipientes presentes no medicamento são: celulose microcristalina, estearato de magnésio, glicolato de amido sódico e lactose anidra. Os comprimidos se caracterizam como arredondados de coloração branca a levemente amarelada possuindo peso médio de, aproximadamente, 250mg. Para a realização tanto dos métodos analíticos qualitativos quanto do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos quantitativos foi utilizado o lote Z0013.

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para o desenvolvimento de cromatografia em camada delgada foram utilizados VLG SQR, os comprimidos contendo vildagliptina e a sitagliptina, composto pertencente à mesma classe da vildagliptina (inibidor da DPP-4). A

migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas de gel-sílica 60 F₂₅₄ (MERCK) com 10 cm de comprimento, 6 cm de largura e 0,25 mm de espessura da camada absorvente. Foi empregado como revelador vapor de iodo obtido a partir de iodo metálico de grau analítico (SYNTH).

As substâncias VLG SQR, vildagliptina e sitagliptina foram pesadas em balança analítica e suas soluções foram preparadas em balão volumétrico e diluídas em metanol até a concentração de 1 mg/mL. O solvente orgânico utilizado foi de grau analítico.

Os sistemas eluentes testados englobaram os seguintes componentes em diferentes combinações e proporções: tolueno, acetato de etila, hexano, clorofórmio, diclorometano, metanol, acetona, trietilamina e acetato de amônio. O sistema eluente selecionado foi constituído de: metanol: clorofórmio (7:3). A aplicação das soluções contendo os fármacos foi realizada nas placas com o auxílio de tubos capilares a uma distância de 1,5 cm da borda inferior das mesmas, que foram posicionadas nas cubas previamente saturadas com o sistema eluente. Após a migração da fase móvel, as placas foram retiradas das cubas e mantidas à temperatura ambiente para a secagem. A visualização das manchas foi realizada através da exposição aos vapores de iodo.

O cromatograma da VLG SQR, da solução amostra contendo vildagliptina e da sitagliptina, bem como seus respectivos valores de fatores de retenção (R_f) podem ser visualizados na Figura 1.5. O R_x obtido pela razão entre o R_f da VLG e o R_f da sitagliptina foi de 0,66. A identificação da VLG foi efetuada através da comparação dos valores de R_f obtidos pela solução amostra e pela substância referência, sendo igual a 0,58 para ambas.

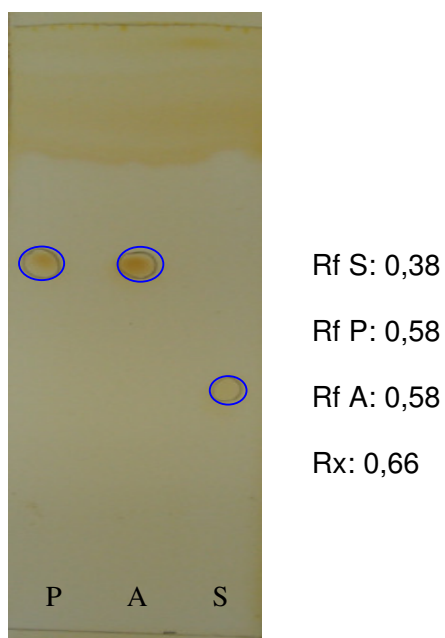


Figura 1.5. Cromatograma e valores de Rf obtidos por CCD na análise de vildagliptina SQR (P), de vildagliptina extraída dos comprimidos (A) e de sitagliptina (S), com revelação por vapor de iodo.

O resultado obtido é considerado adequado já que ocorre uma boa separação entre o padrão de comparação (sitagliptina) e as manchas de padrão e amostra de vildagliptina, as quais aparecem no mesmo tempo de retenção pelo método proposto.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a análise, foram utilizadas as amostras de VLG SQR e dos comprimidos contendo VLG, descritas no item 2.2. As soluções amostra e SQR foram preparadas em água, na concentração de 50 µg/mL, e filtradas em filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro (MILLIPORE).

A fase móvel foi composta de água e acetonitrila de grau analítico (85:15). Para o ajuste do pH da fase móvel foi adicionada trietilamina 0,3% e o pH foi

ajustado para 7,0 com ácido fosfórico 10%. A fase móvel foi filtrada em filtros de nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido da marca Agilent equipado com bomba quaternária modelo Q1311A e detector com arranjo de fotodiodos G1315B. O controle do equipamento assim como os dados e respostas obtidos pelo sistema cromatográfico foram realizados com auxílio do programa ChemStation.

A análise foi realizada utilizando as condições cromatográficas mostradas na Tabela 1.4:

Tabela 1.4. Condições cromatográficas utilizadas

Característica	Descrição
Fase móvel	Água pH 7,0 : Acetonitrila (85:15 v/v)
Coluna	Waters XBridge™ C8 (150 × 4,6 mm, 5 µm)
Fluxo	1,0 mL/min
Comprimento de onda	207 nm
Volume de injeção	20 µL
Temperatura de análise	25 °C

Os cromatogramas obtidos foram comparados e, tanto amostra quanto padrão de vildagliptina apresentaram o mesmo tempo de retenção (Figura 1.6).

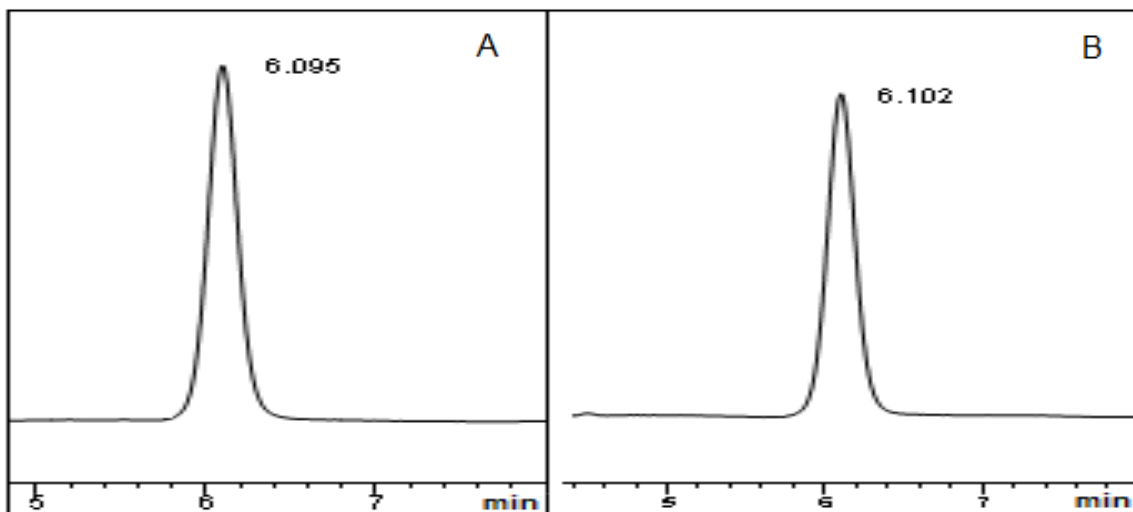


Figura 1.6. Cromatogramas do padrão (A) e amostra (B) de VLG usando fase móvel composta de água pH 7,0 e acetonitrila (85:15 v/v) e coluna Waters XBridge™ C8 (150 × 4,6 mm, 5 µm), na concentração de 50 µg/mL.

Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

As soluções de VLG SQR e dos comprimidos contendo VLG, descritas no item 2.2, foram utilizadas para análise. Foram utilizados água e papel filtro (FRAMEX) para o preparo das amostras.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo 1800, com duplo feixe, acoplado a um computador, utilizando o programa UV Probe versão 2.33. Para a realização das medidas espectrofotométricas foram utilizadas cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

Para o preparo da solução referência, VLG SQR foi pesada, dissolvida em água em balão de 100 mL e submetida a banho de ultra-som durante 10 minutos. O volume foi completado com o mesmo solvente obtendo-se concentração final de 0,5 mg/mL. Essa solução foi diluída apropriadamente obtendo-se concentração final de 100 µg/mL.

Para o preparo da solução amostra, comprimidos contendo 50 mg de VLG foram triturados a pó fino. Pesou-se quantidade suficiente de amostra que foi

transferida para balão volumétrico de 100 mL, dissolvida em água, levada ao banho de ultra-som por 10 minutos, filtrada em papel filtro e diluída até a concentração de 0,5 mg/mL. Essa solução foi diluída apropriadamente em água obtendo-se concentração final de 100 µg/mL.

Os espectros obtidos foram sobrepostos e comparados quanto a seus perfis característicos a partir de leituras realizadas entre os comprimentos de onda de 200 a 300 nm (Figura 1.7).

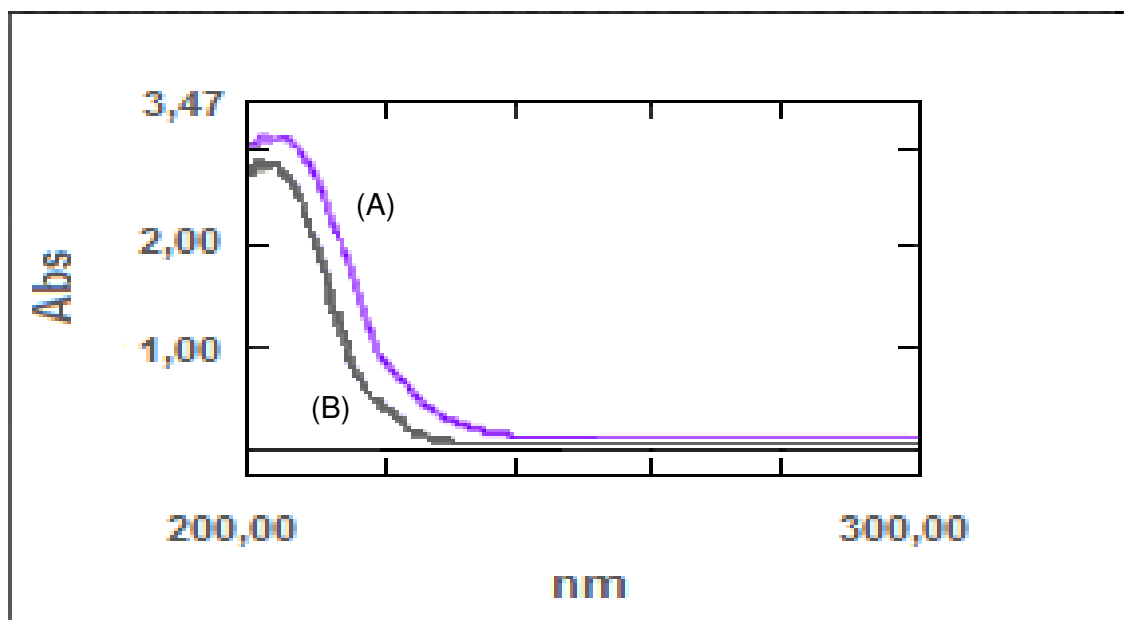


Figura 1.7. Espectros sobrepostos obtidos na região UV para a SQR (A) e a amostra (B) de vildagliptina na concentração de 100 µg/mL.

3. Conclusão

A partir da determinação da solubilidade da VLG SQR foi possível verificar o tipo de solvente adequado para a realização dos estudos relacionados ao fármaco.

Pela análise por DSC verificou-se um ponto de fusão de 146,5 °C, com perfil afilado, sendo este fator indicativo de pureza da vildagliptina SQR. A realização do ensaio para verificar a faixa e o ponto de fusão, utilizando equipamento automático para essa determinação, confirmou o ponto de fusão apresentado pela análise por

DSC indicando, assim, conformidade dos resultados obtidos pelos dois métodos. Dessa forma, ambos podem ser utilizados para identificação e avaliação da pureza do fármaco.

As bandas analisadas por espectrofotometria no infravermelho, referentes aos grupos funcionais da molécula do fármaco, permitiram concluir que esta técnica serviu como indicativo de que se tratava do fármaco em estudo (indicativo da identidade da molécula).

O método por CCD demonstrou perfis de migração semelhantes para o padrão e a amostra de vildagliptina, ou seja, ambas mostraram o mesmo fator de retenção na placa cromatográfica com o sistema eluente proposto. Também, foi possível diferenciar a sitagliptina da vildagliptina demonstrando, assim, que o método para a identificação do fármaco foi seletivo e adequado. A metodologia desenvolvida possui as vantagens de ser extremamente fácil, rápida e de custo reduzido quando comparada a outras técnicas.

Pela observação dos cromatogramas e espectros obtidos por CLAE e UV, respectivamente, foi possível realizar a identificação da VLG SQR. Tanto a VLG SQR quanto a amostra de comprimidos apresentaram cromatogramas semelhantes. Na análise por UV, foram obtidos espectros semelhantes tanto para a amostra quanto para o padrão. Dessa forma, ambas as técnicas desenvolvidas permitiram a identificação da SQR demonstrando estarem de acordo com a proposta pretendida.

As análises realizadas permitiram demonstrar que a VLG SQR é adequada para ser utilizada nos estudos propostos por esse trabalho. Ainda, foi possível obter o ponto de fusão do fármaco que não está descrito na literatura disponível, por duas técnicas distintas que corroboram o valor encontrado de fusão da substância analisada.

4. Referências

CLAS, SD; DALTON, CR; HANCOCK, BC. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *PSTT*, v. 2, 1999.

FARMACOPÉIA. *Farmacopéia Brasileira*. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988, parte IV.

ICH. International Conference on Harmonisation. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH Secretariat, 2005

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.49, p.627-631, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: _____. *Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry*. 3. ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001. cap. 3, p. 138-156.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*, 7ed. New York: John Wiley & Sons, 2006.

USP 32. *THE UNITED STATES PHARMACOPEIA*. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

WATSON, G. D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 2005. cap. 7, p. 145-166.

**CAPÍTULO II. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV
para análise de vildagliptina em comprimidos e estudo de estabilidade**

O objetivo deste capítulo foi a validação de um método desenvolvido para realizar a quantificação de vildagliptina presente em comprimidos. Os parâmetros avaliados na validação do método foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação e os resultados estão de acordo com os códigos oficiais. Posteriormente à validação da metodologia analítica, foi realizada uma análise por espectrometria de massas para verificação da massa do produto de degradação majoritário formado nos estudos de estresse sob as condições às quais o fármaco é susceptível à degradação (básica, oxidativa e térmica). Após a verificação da massa do produto de degradação foi possível propor a estrutura molecular para o produto majoritário nas condições de estresse testadas.

Manuscrito submetido ao Journal of Chromatographic Science

**Stability-indicating RP-LC Method for the Determination
of Vildagliptin and Its Degradation Products**

Amanda Thomas Barden*, Bárbara Salamon, Elfrides E. S. Schapoval, Martin Steppe

*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande
do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil*

* Corresponding author: Tel: +55 51 33085214, Fax: +55 51 33085378
E-mail address: amandatbarden@gmail.com (Amanda Thomas Barden)

Abstract

A simple, precise and stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method was developed and validated for the determination of vildagliptin (VLG) in pharmaceutical dosage form. The LC method was carried out on a XBridge™ C8 column (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm), maintained at room temperature (23 ± 1°C). The mobile-phase consisted of acetonitrile and a solution of triethylamine 0.3% pH 7.0 (adjusted with phosphoric acid) (15:85; v/v), run at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ and using photodiode array (PDA) detection at 207 nm. The chromatographic separation was obtained within 6 min and was linear in the range of 20-80 µg mL⁻¹ (R² = 0.9999). Experimental limit of detection and limit of quantitation were 0.63 µg mL⁻¹ and 2.82 µg mL⁻¹, respectively. The method was validated in accordance to ICH guidelines acceptance criteria for specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and system suitability. Stress studies were carried out and no interference of the degradation products was observed. There was no interference of the excipients in the determination of VLG. Furthermore, the major degradation product obtained of the stress studies (thermal, oxidative and alkaline hydrolysis) was evaluated by mass spectrometry (MS) and its molecular structure was predicted. Basic degradation was determined as first-order kinetics, with constant *k* of 0.00443 min⁻¹ and *t*_{90%} of 23.93 min. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of VLG in tablet dosage form, contributing to improve the quality control and studies of stability of pharmaceutical tablets containing this drug.

Keywords: Vildagliptin, reversed-phase liquid chromatography, stability-indicating method, validation, basic degradation.

Introduction

Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitors represent a new class of antidiabetic agents that improve glycemic control by preventing glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) degradation. These intestinal peptides, also known as incretins, are postprandially secreted and lead to a rise in insulin secretion [1].

Vildagliptin (VLG), (S)-1-[N-(3-hydroxy-1-adamantyl) glycyl] pyrrolidine-2-carbonitrile, is a potent and selective dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor that improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus by increasing α - and β -cell responsiveness to glucose [2]. The chemical structure of drug is shown in Fig. 1.

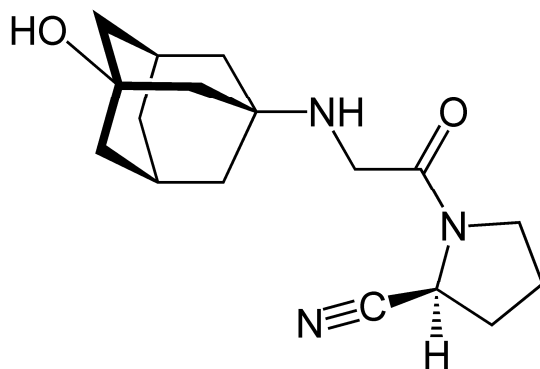


Figure 1. Chemical structure of VLG.

The pharmaceutical product is commercially available, but at the moment, there are no methods published for the quantitative analysis of VLG as active pharmaceutical ingredient or finished product.

Therefore, the purpose of the present research work was to develop and validate a simple, fast, accurate and stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method for the determination of VLG in solid pharmaceutical dosage form.

Experimental

Materials and reagents

The reference standard (purity of 99.5%) was purchased from Sequoia Researched Products (United Kingdom) and the commercial tablets of Galvus[®] (Novartis Biociências S. A., SP, Brazil) containing 50 mg of VLG were obtained from commercial sources within their shelf life period. LC grade acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, OH, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. Purified water was obtained by a Millipore[®] Direct-Q 3UV with pump (Molsheim, AL, France).

Apparatus and analytical conditions

Liquid chromatography

The liquid chromatography (LC) method was carried out on an Agilent liquid chromatograph (Santa Clara, CA, United States) equipped with a model Q1311A quaternary pump, ALS-G1329A auto sampler, TCC-G1316A column oven, G1315B photodiode-array detector and ChemStation manager system software was used to control the equipment and to calculate data and responses from the LC system. The experiments were performed on an analytical column XBridge[™] C8 (150 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) (Waters, Ireland). The LC system was operated isocratically, at room temperature, using a mobile-phase consisted of acetonitrile and a solution of triethylamine 0.3% adjusted to pH 7.0 with phosphoric acid (15:85; v/v) at a flow-rate of 1.0 mL min⁻¹, and using photodiode array (PDA) detection at 207 nm. The injection volume was 20 µL of the solutions containing 50 µg mL⁻¹ for working standard and sample solutions.

Mass spectrometry

Mass spectrometric analysis was performed using a Quattro Micro (triple-quadrupole) instrument from Micromass (Manchester, UK) working with an

electrospray ionization interface operating in a positive mode (ESI+), set up in scan mode. The mass spectrometer conditions were optimized with direct injection (Baby Bee syringe pump, Bioanalytical Sciences, West Lafayette, IN, USA) of the VLG reference solution and its solutions submitted to thermal degradation process, oxidation and alkaline hydrolysis into the system in the concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. The best response was obtained with an ESI capillary potential of 3.2 kV, cone voltage of 30 V, RF lens voltage of 0.3 V, source temperature of $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and ESI probe temperature of $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Before the analysis, the samples were diluted in methanol:water (50:50, v/v), and introduced into the mass spectrometer by direct infusion at $10 \mu\text{L}/\text{min}$. The data acquisition and system controlling were obtained using MassLynx version 3.5 software from Micromass. The MS data were acquired in the m/z range between 100 and 500 amu.

Solutions

Preparation of reference substance solutions

Stock solutions were prepared by weighing accurately, 50 mg of VLG reference substance, transferred to individual 100 mL volumetric flasks and diluted to volume with water, obtaining the concentration of 0.5 mg mL^{-1} . The stock solutions were stored at $2\text{-}8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ protected from light and daily diluted to appropriate concentration in mobile-phase.

Preparation of sample solutions

Tablets containing 50 mg of VLG were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into an individual 100 mL volumetric flask, diluted to volume with water, sonicated for 10 minutes and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (Millipore, Bedford, USA), obtaining the concentration of 0.5 mg mL^{-1} of VLG. This stock solution was stored at $2\text{-}8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and protected from light. Working sample solutions were prepared daily by diluting the stock solution to the appropriate concentration in mobile-phase.

Method Validation

The method was validated using samples of pharmaceutical formulation with the label claim of 50 mg of VLG by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LoD), limit of quantitation (LoQ) and robustness following the International Conference on Harmonization (ICH) guideline [3,4]. Moreover, stability-indicating capability was demonstrated by performing stress studies, also called forced degradation [5].

Specificity

Specificity is the ability to assess unequivocally the analyte in the presence of components which may be expected to be present, such as impurities, degradation products or excipients [3]. A stability-indicating method can selectively analyze the active pharmaceutical ingredient (API) from the pharmaceutical product. Method can be developed both to determine only the API or only the impurity or degradation product as to separate and determine the API in presence of its impurities and degradation products [6,7]. The sample solutions (0,5 mg mL⁻¹ of VLG) were submitted to accelerated degradation to evaluate the interference in the quantification of the compound and to provide an indication of the stability-indicating property and specificity of the proposed method. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all the tablet excipients) and a sample containing placebo added to VLG at the concentration of 50 µg mL⁻¹. For peak purity test, the photodiode array detector (PDA) was used and established the stability-indicating capability of the method by determining the peak purity of VLG in the degraded samples. The stress conditions analyzed were the following:

(a) Acid hydrolysis: sample solution was prepared and maintained in 1.0M hydrochloric acid for 24 h and stored at room temperature. After that, 5.0 ml of this solution were removed and neutralized with 1.0M sodium hydroxide and diluted until the concentration of 50.0 µg mL⁻¹ in mobile phase.

(b) Basic hydrolysis: sample solution was prepared and maintained in 0.1M sodium hydroxide for 2 h and stored at room temperature. After that, 5.0 ml of this solution were removed and neutralized with 0.1M hydrochloric acid and diluted until the concentration of $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ in mobile phase.

(c) Oxidative degradation: sample solution was prepared in H_2O_2 solution 0.3% and stored at room temperature for 2 h. After that, 5.0 ml of this solution were removed and diluted until the concentration of $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ in mobile phase.

(d) Thermal degradation: sample solution was exposed at 60°C for 240 h. After that, 5.0 ml of this solution were removed and diluted until the concentration of $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ in mobile phase.

(e) Photodegradation: sample solutions were induced by exposing to 200 watt hours/square meter of near UV light emitting UV-A radiation (352 nm) for 24 h. Sample solutions were submitted likewise by UV-C radiation (254 nm) during 24 h. Control samples were protected from light with aluminum foil and, similarly, were exposed to radiation. The study was performed exposing the solutions in quartz cells into de photodegradation chamber. After that, these solutions were diluted until the concentration of $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ in mobile phase.

Linearity

Linearity was determined by constructing three analytical curves independently, each one with seven reference substance concentrations, in the range of $20\text{-}80 \mu\text{g mL}^{-1}$ of VLG, prepared in mobile-phase. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentration of VLG to obtain the analytical curve. The results were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation, determination coefficient and by ANOVA for compliance of the linear model.

Precision and accuracy

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was verified by six independent sample preparations of the same concentration of VLG, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was determined by the recovery of known amounts of VLG reference substance added to the samples in the beginning of the preparative process. The added levels were 25, 50 and 75% of the nominal drug concentration. The results were expressed as the percentage of VLG reference substance recovered from the sample.

Limits of detection and quantitation

The LD and LQ were calculated and obtained experimentally based on signal-to-noise approach. The background noise was obtained after injection of the blank, observed over a distance equal to 20 times the width at half-height of the peak in a chromatogram obtained by the injection of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the reference substance. The signal-to-noise ratio applied was 10:1 for the LQ and 3:1 for the LD [8].

Robustness

Robustness can be described as the ability to reproduce the analytical method in different laboratories or under different circumstances without the occurrence of unexpected differences in the obtained results [9]. The robustness of an analytical procedure refers to its ability (measure of its capacity) to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis [3,10]. VLG standard and sample were analyzed under identical experimental conditions. Robustness was investigated with the factors summarized in Table 1.

Table 1. Factors and levels investigated during robustness testing

Factor	Nominal	Levels investigated (-1; +1)
pH of aqueous phase	7.0	6.8; 7.2
% of triethylamine	0.3	0.28; 0.32
% of acetonitrile	15	14; 16
Temperature (°C)	25	23; 27
Flow (mL min ⁻¹)	1.0	0.8; 1.2
Column manufacturer	Waters [®]	Ace [®] ; Waters [®]

Solution stability

To generate reproducible and reliable results, the stability of sample solutions, standards, reagents and mobile-phase must be determined prior to initiating the method validation studies. It is often essential that solutions be stable enough to allow for delays such as instrument breakdowns or overnight analyses using autosamplers [11]. To assess the stability of sample solutions of VLG, the samples were maintained at 2-8 °C for 72 h and also placed into the autosampler, at room temperature, for 24 h. The stability of these solutions compared with freshly prepared solutions and of the mobile-phase was studied and any change in the chromatographic pattern was observed.

System suitability

System suitability tests are used to verify that the reproducibility of the chromatographic system is adequate for the analysis to be done. The tests are based on the concept that the equipment, electronics, analytical operations and samples to be analyzed constitute an integral system that can be evaluated as such [12]. System suitability can be based on resolution of two specified components, tailing factor, limit of quantitation or detection, expected retention times or number of theoretical plates [13]. The system suitability test was also carried out to evaluate the reproducibility of

the system for the analysis to be performed. Parameters measured in this study were peak area, retention time, theoretical plates, retention factor, and peak asymmetry.

Degradation kinetics

Sample solution was prepared and maintained in 0.1M sodium hydroxide for 120 min. Basic hydrolysis was carried out according to studies described in the specificity item. At established times (30; 45; 60; 75; 90; 105 and 120 minutes) sample aliquots were withdrawn and diluted in mobile-phase to achieve concentration of 50.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. These solutions were analyzed by LC using the developed and validated method for VLG.

Kinetics degradation was determined by plotting the drug concentration (zero-order process), log (first-order process) and reciprocal concentration (second-order process) versus time. The best regression coefficients obtained indicated the reaction order. The kinetics parameters, constant (k) and $t_{90\%}$, were calculated.

Results and Discussion

Selection and optimization of the chromatographic conditions

The effect of the composition of the column and mobile-phase on the retention time of VLG and on its chromatographic parameters was initially investigated. The chromatographic conditions were chosen after the test of different mobile-phases with distinct proportions of organic solvent (acetonitrile or methanol) and water, with and without triethylamine, in different pH values of the aqueous phases. The adequacy of the mobile-phase was decided on the basis of selectivity and sensitivity of the assay, stability studies and the separation between the degradation products formed during stress studies. The use of triethylamine solution (0.3%; pH 7.0) in combination with acetonitrile (85:15; v/v), at room temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), resulted in a retention time of 6.2 minutes, and a simple mobile-phase (without salt buffer addition), as shown in the typical chromatogram of the Fig. 2.

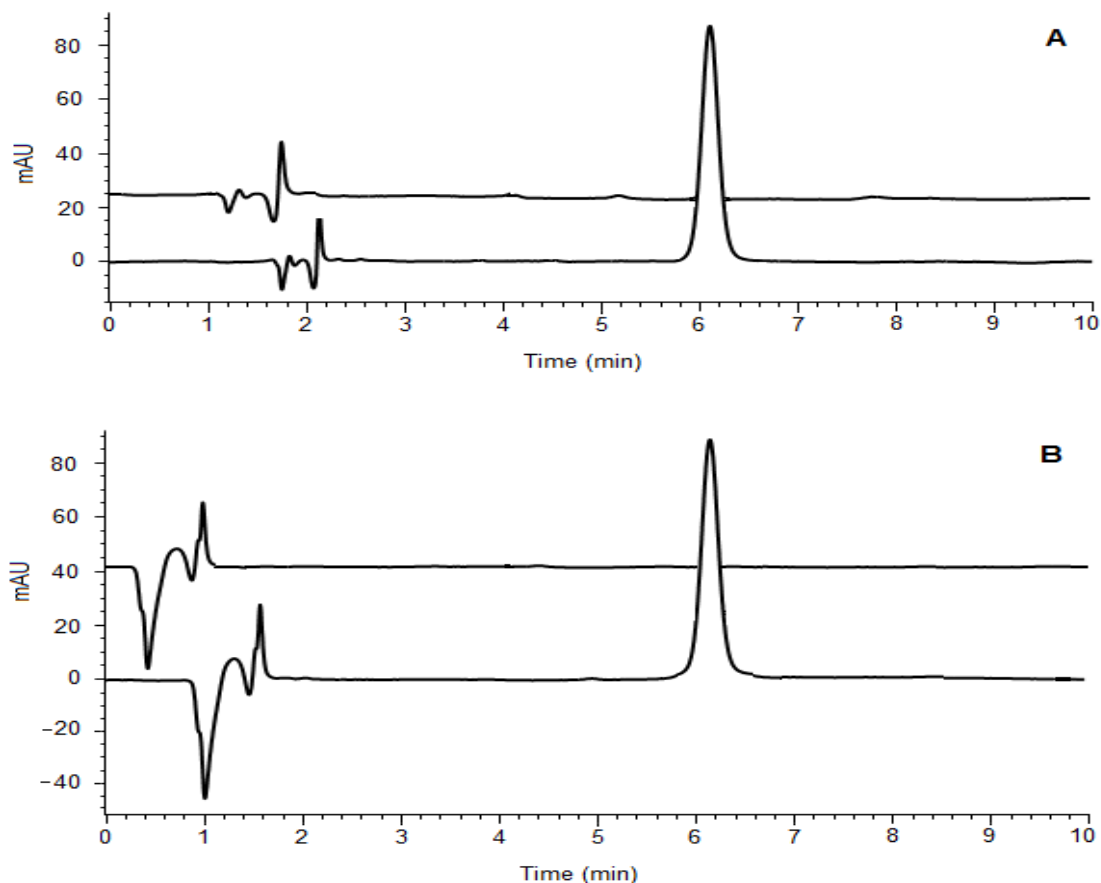


Figure 2A-B. Representatives RP-LC chromatograms of vildagliptin (VLG) reference substance solution and overlap of mobile-phase (A); sample solution and overlap of placebo solution (B). Chromatographic conditions: XBridge™ C8 column (150 × 4.6 mm, 5 μm), 25 °C; mobile phase: triethylamine (0.3%; pH 7.0)/acetonitrile (85:15; v/v); flow rate: 1.0 mL min⁻¹; detection: 207 nm.

The determination of VLG was made at 207 nm and no interference was observed, therefore, this wavelength was utilized. The optimized conditions of the RP-LC method were validated for the analysis of VLG in pharmaceutical formulations, due to the capability and application for the quality control.

Method validation

Specificity and forced degradation studies

Forced degradations were performed to provide indications of the stability-indicating properties of the analytical method, particularly because no information about the potential degradation products is available. For VLG, the oxidative and basic conditions resulted in significant decrease of the area with additional peaks. Under the basic condition, significant decrease of the peak area was observed within 2 h with one additional peak detected at 2.4 min. Under the acid condition no significant decrease in the area of the VLG was exhibited. The acid and photolytic conditions resulted in non-significant reduction of the peak area without any additional peak detected by UV. Under the oxidative condition, a significant decrease of the area of VLG was detected and two small degradation product peaks at around 2.4 min and 4.1 min were seen. Under the thermal condition, decrease of the area was observed within 240 h with two additional peaks detected at 2.9 min and 7.8 min. No interference from formulation excipients was found, showing that the peaks were free from any coeluting peak, thus demonstrating that the proposed method is specific for the analysis of VLG. The stressed samples were, respectively, analyzed and compared to the VLG reference solution spectrum and with the help of PDA was verified the peak purity of VLG in the degraded samples. Moreover, in subsequent studies we analyzed, by mass spectrometer, the reference substance and the main degraded samples. The chromatograms of forced degradation studies are shown in Fig. 3.

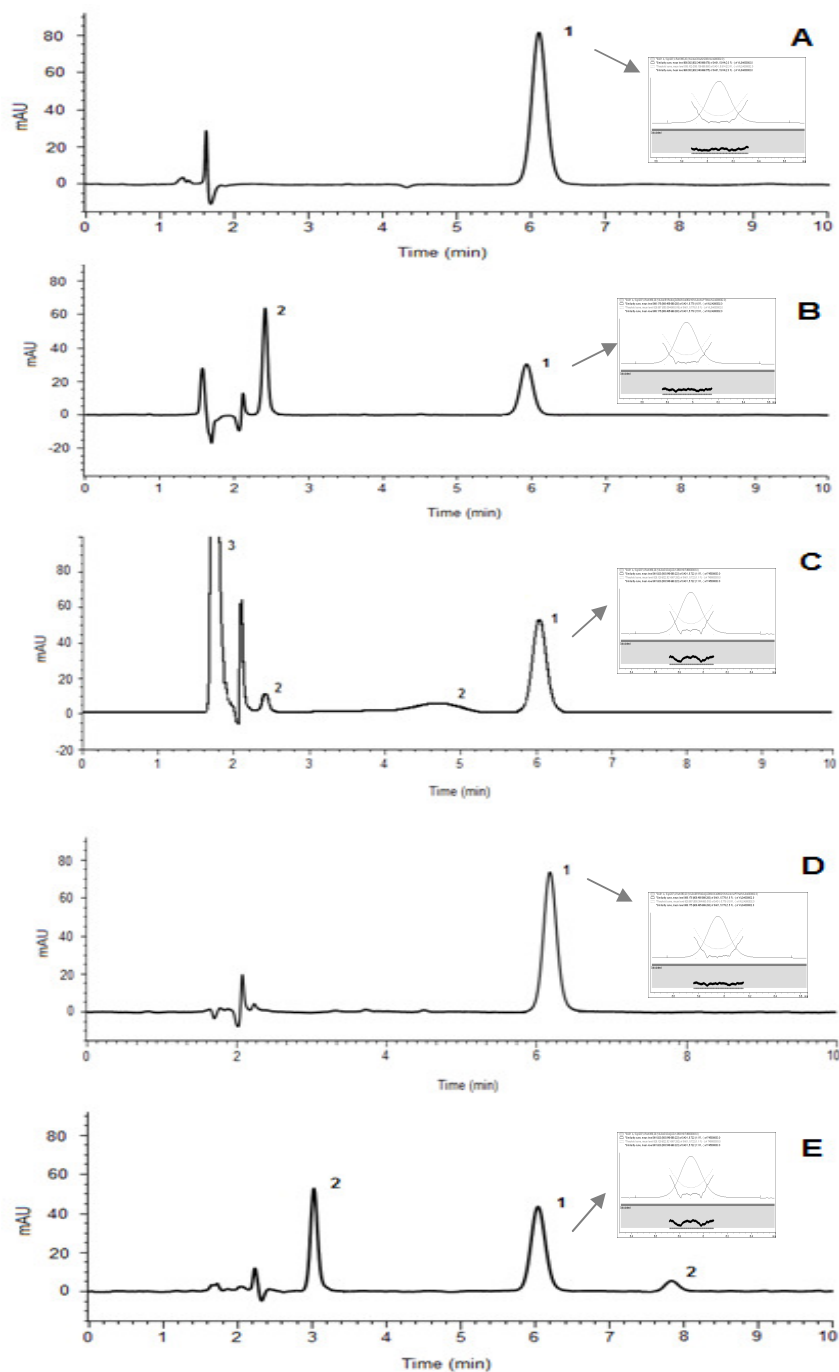
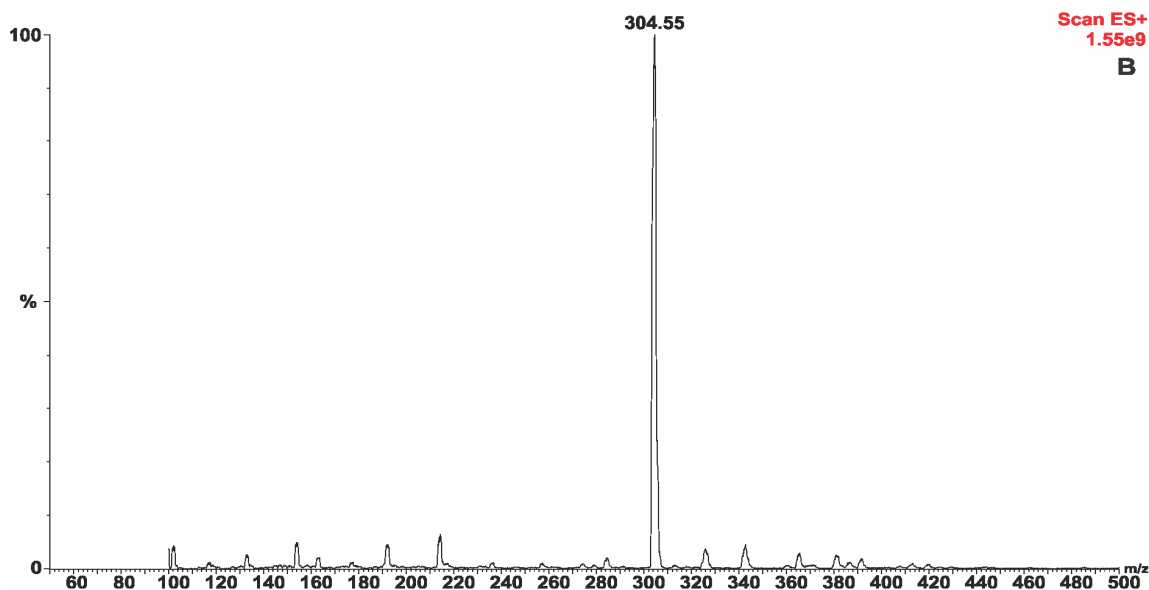
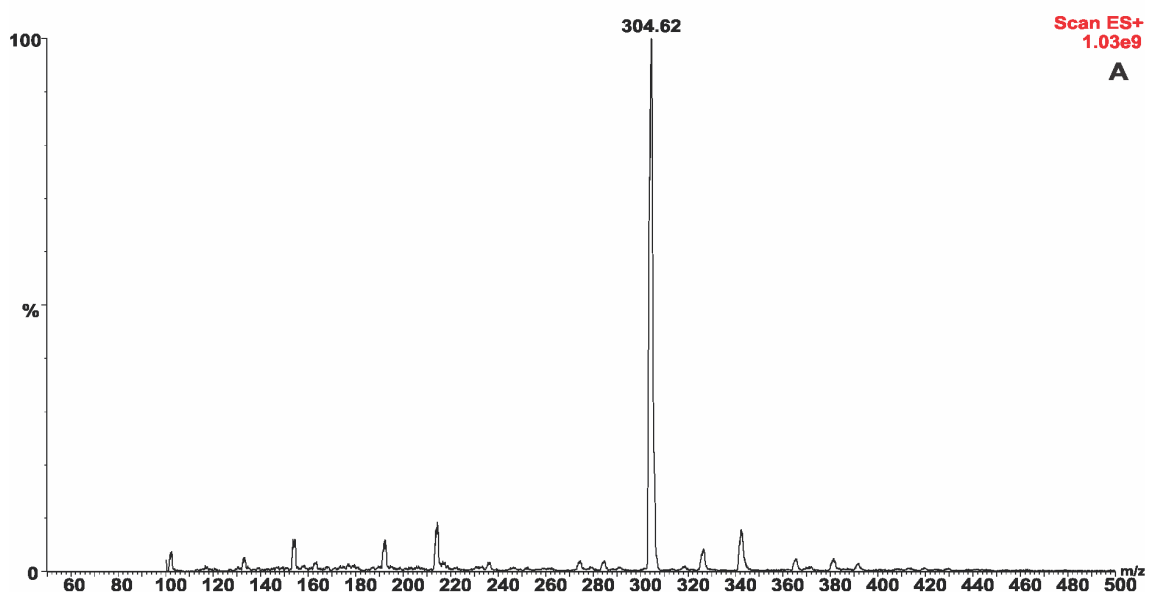


Figure 3A-F. RP-LC chromatograms obtained of vildagliptin drug product (VLG; $50\mu\text{g mL}^{-1}$). (A) acidic hydrolysis; (B) basic hydrolysis; (C) oxidative degradation; (D) photodegradation; (E) thermal degradation. Peak 1: VLG, 2: main degradation process, 3: hydrogen peroxide. Chromatographic conditions: XBridge™ C8 column ($150 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), $25 \text{ }^\circ\text{C}$; mobile phase: triethylamine (0.3%; pH 7.0)/acetonitrile (85:15; v/v); flow rate: 1.0 mL min^{-1} ; detection: 207 nm .

Mass spectrometry

By the analysis of the mass spectrum of the solutions obtained of the studies of forced degradation, more specifically, thermal, oxidative and alkaline degradations it was possible to suggest the possible molecular structure of the major degradation product formed in this conditions. In Scan mode it was possible to verify the additional signal that can be seen at 154 (m/z). The spectra are shown in Fig. 4 and the possible chemical structure attributed to this signal are indicate in Fig. 5. Moreover, analysis by LC/MS/MS will be necessary to confirm this chemical structure.



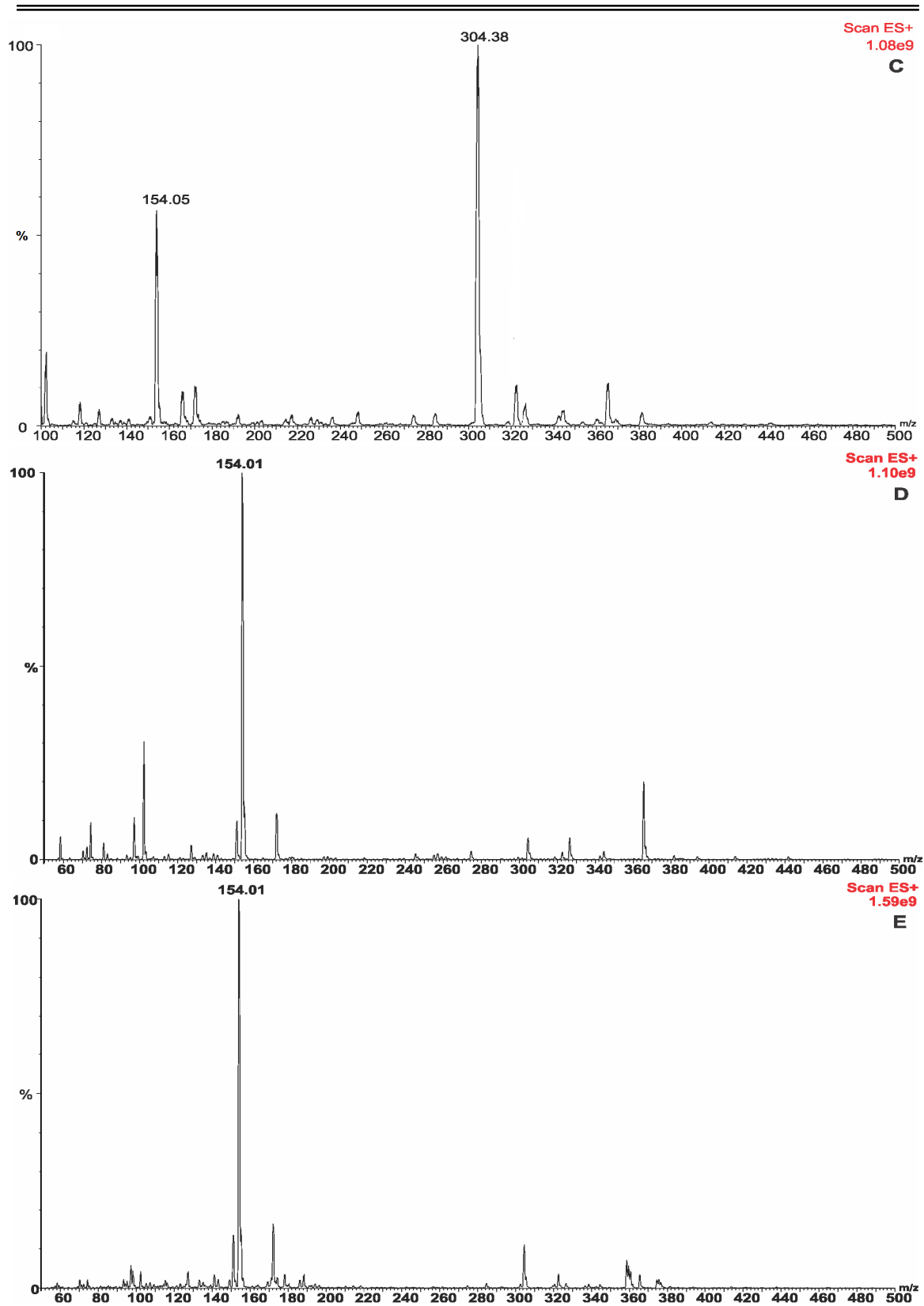


Figure 4A-E. Mass spectra obtained to vildagliptin. **(A)** reference substance; **(B)** sample; **(C)** thermal degradation; **(D)** basic hydrolysis; **(E)** oxidative degradation.

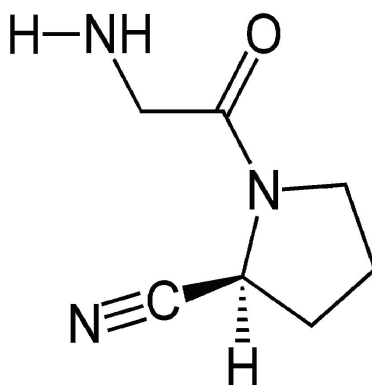


Figure 5. Possible major degradation product formed in all degradation conditions.

Linearity

The analytical curves constructed for VLG were found to be linear in the 20-80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range. The value of the determination coefficient calculated ($R^2 = 0.9999$, $y = 2126352.79x + 12287.36$, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the analytical curve for the method. The variance analysis ($P = 0.05$) was applied to verify the linearity of the method and the results showed that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}} = 77977.56 > F_{\text{critical}} = 4.40$) with no deviation from linearity ($F_{\text{calculated}} = 1.69 < F_{\text{critical}} = 4.53$).

Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.61. The inter-day precision was assessed by analyzing six samples on three different days; the mean values obtained were 97.68% (RSD = 0.71). Between analysts precision was determined by analyzing six samples by two analysts; the values were found to be 97.61% (RSD = 0.59). These results are summarized in Table 2.

Table 2. Inter-day and between-analysts precision data of RP-LC for vildagliptin in samples of pharmaceutical formulation

Day	Inter-day	Between-analysts	
	Assay (%)	Analysts	Assay (%)
1	97.36	A	97.66
	96.79		97.42
	96.88		97.44
	97.26		97.86
	97.32		98.08
	99.23		98.60
2	97.43	B	97.43
	97.12		97.12
	96.90		96.90
	97.97		97.97
	97.97		97.97
3	96.82		96.82
	97.96	Mean ^c	97.61
	98.06	RSD ^d (%)	0.59
	97.99	^c Mean of twelve replicates	
	98.45	^d RSD = relative standard deviation	
	98.85		
	97.96		
Mean ^a	97.68		
RSD ^b (%)	0.71		

^aMean of eighteen replicates^bRSD = relative standard deviation

Accuracy

The accuracy was evaluated by the determination of the analyte in solutions prepared by the standard addition method and expressed in terms of percentage recoveries of VLG from the real samples. The results are shown in Table 3. The mean recovery data were 97.71% (RSD = 0.31), demonstrating that the method is accurate within the desired range.

Table 3. Accuracy of RP-LC in samples of pharmaceutical formulation

Drug	Added Level ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Total Nominal Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean Concentration found ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Accuracy (%)	RSD ^b (%)
Vildagliptin (38.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	10.0 (25%)	50.0	48.07	97.90	
	20.0 (50%)	60.0	57.86	97.88	0.31
	30.0 (75%)	70.0	67.49	97.35	

^aMean of three replicates^bRSD = relative standard deviation*Limits of detection and quantitation*

The LD and LQ were obtained by using the mean of the slope and the standard deviation of the intercept of the independent curves, determined by a linear regression line. The LD calculated was 0.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the LQ was 1.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The LD and LQ determined experimentally were 0.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 2.82 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Robustness

The responses (percentage of VLG in the commercial tablets relative to its label claimed concentration) obtained in relation to the standard solutions are summarized in Table 4.

There were no significant changes in the chromatographic pattern when the modifications were made in the experimental conditions, thus showing the method to be robust. The stability of the sample solutions was studied and the obtained data showed the stability during 24 h into the autosampler and during 72 h when maintained at 2-8 °C.

Table 4. Responses (percentage of VLG in the commercial tablets relative to its label claimed concentration) obtained in relation to the standard solutions after changes in factors investigated by robustness test

Modified Factors	Drug obtained (%)	RSD ^a (%)
Aqueous phase (pH 6.8)	97.49	0.24
Aqueous phase (pH 7.2)	96.74	0.79
Mobile-phase proportion (84:16)	97.47	0.25
Mobile-phase proportion (86:14)	97.89	0.05
Temperature (23 °C)	97.89	0.05
Temperature (27 °C)	97.91	0.07
Flow (0.8 mL min ⁻¹)	97.79	0.02
Flow (1.2 mL min ⁻¹)	98.31	0.35
Column manufacturer (Ace [®])	98.69	0.63
Column manufacturer (Waters [®])	97.82	-

RSD^a = relative standard deviation in relation to normal conditions

^aMean of three replicates

System suitability

Analysis of the VLG standard evaluated at each day presented the approximate results: 6345 of theoretical plates and 0.99 of peak asymmetry. The obtained value for retention factor was 3.60. The experimental results showed that the parameters tested were within the acceptable range, indicating that the system is suitable for the analysis intended [11].

Degradation kinetics

From the specificity studies was observed that by oxidative degradation the reaction occurred very quickly, thus avoiding the realization of the kinetics under this condition and by thermal degradation, during the period of 240 h, was obtained a degradation rate of the drug too low. Thus, it was chosen to carry out the degradation kinetics by alkaline hydrolysis. The chromatograms obtained showed a reduction in peak area by the time. Concentration, concentration log and reciprocal concentration of the remaining VLG versus time are shown in Fig. 6.

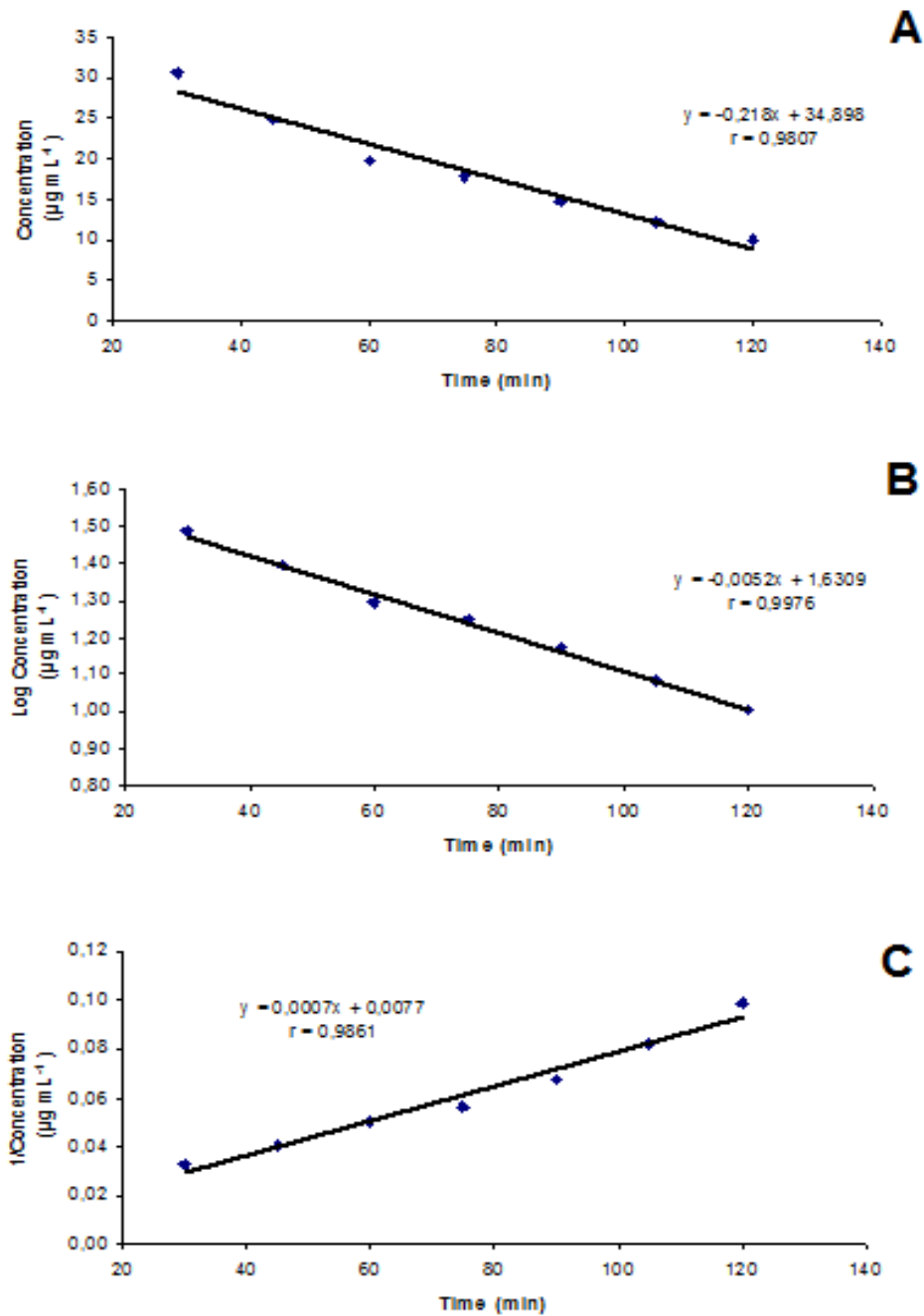


Figure 6A-C. Values of concentration, concentration log and reciprocal concentration of the remaining VLG versus time (A) zero-order reaction; (B) first-order reaction; (C) values second-order reaction.

By evaluation of the correlation coefficient, the degradation process follows first-order kinetics. It was possible, from the slopes of the straight lines, to calculate the first-order degradation constant $k = 0.00443 \text{ min}^{-1}$ and $t_{90\%} = 23.93 \text{ min}$.

Conclusion

Results of the validation studies show that the stability-indicating RP-LC method is specific, accurate, and robust and possesses significant linearity and precision, without any interference from the excipients and degradation products. Degradation studies showed that the degradation by basic hydrolysis follow first-order kinetics. The proposed method was successfully applied for the quantitative analysis of VLG in tablets, may thus be used for routine analysis, quality control and for studies of stability of pharmaceutical tablets containing this drug.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the financial support.

References

- [1] M.M. Jost, J. Lamerz, H. Tammen, C. Menzel, I. De Meester, A.M. Lambeir, K. Augustyns, S. Scharpe, H.D. Zucht, H. Rose, M. Jurgens, P. Schulz-Knappe, P. Budde, In vivo profiling of DPP4 inhibitors reveals alterations in collagen metabolism and accumulation of an amyloid peptide in rat plasma, *Biochemical Pharmacology*. 77 (2009), 228-237.
- [2] G. Bolli, F. Dotta, L. Colin, B. Minic, M. Goodman, Comparison of vildagliptin and pioglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin, *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 11 (2009), 589-595.
- [3] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). (2005) 1 – 13.
- [4] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2). (2003) 1 – 18.
- [5] FDA, Laboratory Operations, Applications and Programs, Food and Drug Administration, Volume III, Section 5, 2003.
- [6] N.V.V.S.S. Raman, K.A. Harikrishna, A.V.S.S. Prasad, K. Ratnakar Reddy, K. Ramakrishna, Development and validation of a stability-indicating RP-LC method for famciclovir, *Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis*. 50 (2009), 797-802.
- [7] M. Bakshi, S. Singh, Development of validated stability-indicating assay methods – critical review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 28 (2002) 1011 – 1040.
- [8] J. Ermer, C. Burgess, Detection and Quantification Limit, in: J. Ermer, J.H.McB. Miller (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, Weinheim, 2005, pp. 101 – 119.
- [9] Y.V. Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 24 (2001) 723 – 753.
- [10] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, Ruggedness and robustness testing, *Journal of Chromatography A*. 1158 (2007) 138 – 157.

[11] G.A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, Journal of Chromatography A, 987 (2003) 57-60.

[12] The United States Pharmacopeia 32th (2009), Rockville, MD.

[13] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for Pharmaceuticals Scientists. John Wiley & Sons, New Jersey, 2007.

CAPÍTULO III. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria UV derivada para análise de vildagliptina em comprimidos

O objetivo deste capítulo foi a validação de método por espectrofotometria UV derivada para a quantificação de vildagliptina presente em comprimidos. Os parâmetros avaliados na validação do método foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez (usando delineamento experimental pelo método de Plackett-Burman para avaliação da influência dos fatores selecionados para verificação da robustez do método) e os resultados obtidos estão de acordo com os códigos oficiais. Posteriormente à validação da metodologia analítica, foi realizado estudo comparativo entre os dois métodos desenvolvidos e validados para quantificação do fármaco em questão (por CLAE e UV derivada) e não foi detectada diferença significativa no teor de vildagliptina.

Manuscrito submetido ao Current Pharmaceutical Analysis

**UV derivative method for determination of vildagliptin in tablets using an
Experimental Design and comparison with HPLC**

A. T. Barden, B. Salamon, M. Steppe

*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande
do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil*

Address correspondence to A. T. Barden, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga, 2752 Lab. 402, Porto Alegre - RS CEP 90610-000, Brazil. E-mail: amandatbarden@gmail.com

ABSTRACT

Validation of UV derivative method was performed for quantitative determination of vildagliptin (VLG) in tablets using water as solvent. The method was validated in accordance to ICH guidelines acceptance criteria for specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. Because excipients of the formulation interferes in the specificity of the UV zero order method, was utilized the UV second order derivative method at 220 nm, with delta lambda 8 and scaling factor 20. The method was linear ($R^2 = 0,9997$) at concentrations ranging from 25 to 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$, precise, exact and robust. The results confirmed that the method is valid and useful for the routine quality control of VLG in tablets. The method was compared to a high performance liquid chromatography method (HPLC), which was previously developed and validated for the same drug. There was not significative difference between the methods for vildagliptin quantitation.

Keywords: experimental design, quantitative determination, robustness, UV derivative method, validation, vildagliptin.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a progressive disease characterized by deterioration of pancreatic islet cell function and increased insulin resistance [1]. It is a disease of multiple etiologies that affects quality of life of affected individuals [2]. This pathology is a major public health problem due to its high frequency in the population, its complications, mortality and high financial and social costs involved in treatment [3].

Inhibitors of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), represent a new class of antidiabetic agents for the treatment of type 2 diabetes, which improves glycemic control by preventing the degradation of peptide-1, similar to glucagon (GLP-1) and insulinotropic peptide, dependent on glucose (GIP). These intestinal peptides, also known as incretins, are released by the intestine throughout the day, and levels increased in response to a meal [4].

Vildagliptin (VLG), (S)-1-[N-(3-hydroxy-1-adamantyl) glycyl] pyrrolidine-2-carbonitrile (Figure 1), is a potent and selective dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor that improves glycaemic control in patients with type 2 diabetes mellitus by increasing α - and β -cell responsiveness to glucose. It was approved in Europe as a complementary therapy to metformin, sulfonylurea or thiazolidinone [5].

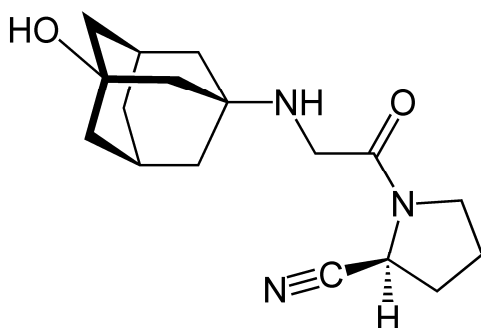


Figure 1. Chemical structure of VLG

Spectrophotometric methods are the most commonly used techniques and continue to enjoy wide popularity. The common availability of the instrumentation, the

simplicity of procedures, speed, precision and accuracy of the technique still make spectrophotometric methods attractive. Also, spectrophotometric methods of analysis are more economic and simpler, compared to methods such as chromatography and electrophoresis. Derivative spectrophotometry in the UV region is a useful technique in extracting qualitative and quantitative information from overlapping bands of the analytes and interferences. The analytical technique consists in the differentiation of normal spectrum by mathematical transformation of spectral curve into a derivative (first- or higher derivatives) [6].

The objective of this study was to demonstrate the viability of use of the ultraviolet derivative method to develop and to validate a simple, fast and low cost method to quantify VLG in solid pharmaceutical dosage form. Besides, the comparison of this results with those obtained from the HPLC analysis is presented.

EXPERIMENTAL

Samples

VLG reference standard (99.50%) was purchased of Sequoia Researched Products (United Kingdom) and the commercial tablets of Galvus® (Novartis Biociências S. A., SP, Brazil) containing 50 mg of VLG were obtained from commercial sources within their shelf life period. The excipients contained in the dosage form (lactose, microcrystalline cellulose, sodium starch glycolate and magnesium stearate) were all of pharmaceutical grade and acquired from different suppliers.

Instrumentation and Conditions

Spectrophotometric measurements were made using a 1.0 cm quartz cell on a Shimadzu 1800 double beam UV–vis spectrophotometer coupled computer loaded with Shimadzu UV Probe software of version 2.33.

Preparation of reference standard and sample solutions

The reference substance was accurately weighed and dissolved in a 100 mL volumetric flask with water to produce a concentration of 0.5 mg mL⁻¹ in vildagliptin. This solution was diluted appropriately to yield a final concentration of 100.0 µg mL⁻¹.

To prepare the sample solution, tablets containing 50 mg of VLG were accurately weighed and crushed to fine powder. An appropriate amount was transferred into an individual 100 mL volumetric flask, diluted to volume with water and sonicated for 10 minutes obtaining the concentration of 0.5 mg mL⁻¹ of VLG. The volume was completed with the same diluent and an aliquot of 2.0 mL of this solution was diluted in a 10 mL volumetric flask to yield a final concentration of 100.0 µg mL⁻¹.

The placebo solution was prepared by mixture of simulated excipients of formulation and diluted appropriately in water until the concentration in which these excipients were present in pharmaceutical dosage form.

Procedure

The stability of reference and sample solutions was evaluated at room temperature (23 ± 1 °C) during 24 h. The stability of these solutions was verified by observing any change in the spectrophotometric pattern, comparing with freshly prepared solutions. Absorbance of the derivative spectra was measured at 220 nm for VLG determination.

The absorption spectra of the samples were recorded between 200 nm and 300 nm against a reagent blank (water). The zero-order spectra of pure drug was stored individually within the above concentration ranges and was derivatized in second order, by zero-crossing method, using delta lambda 8 and scaling factor 20.

Method validation

The method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness following the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines [7] [8].

The specificity of the method was performed by preparing a placebo containing the same excipients of the commercial product. The placebo solution absorbs in the same wavelength as vildagliptin (207 nm). Thus, was used the method by derivative ultraviolet spectrophotometry to remove the interference of the placebo and accomplish only the determination of vildagliptin in tablets.

The linearity was realized by three calibration curves that were prepared with seven concentrations (25, 50, 75, 100, 125, 150 and 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of the reference standard. The obtained absorbances were plotted against the respective concentrations of drug to obtain the analytical curve. The regression line was determined by the method of least squares and the curves were validated by means of the analysis of variance.

The precision was realized through six samples, at the same concentration (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), under the same experimental conditions in the same day for intra-day precision (repeatability) and on three different days for inter-day precision (intermediate precision). The relative standard deviation (RSD) was determined.

The accuracy was calculated in relation of the percentage of recovery by the assay of the known added amount of vildagliptin reference substance in the sample solutions using three concentrations levels covering the specified range (125, 150 and 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and three replicates of each concentration.

The robustness test examines the potential sources of variability in one or a number of responses of the method. To examine potential sources of variability, a number of factors are selected from the operating procedure and examined in an interval that slightly exceeds the variations which can be expected when a method is transferred from one instrument to another or from one laboratory to another. These factors are then examined in an experimental design, as the Placket-Burman, and the effect of the factors on the response(s) of the method were evaluated [9]. The

robustness test was accomplished through experimental design by Plackett-Burman. The factors and levels studied for the robustness test are presented in Table 1. After determination of the number of real factors to be examined, the remaining columns in the design were defined as dummy factors. A dummy factor is an imaginary factor for which the change from one level to the other has no physical meaning. The experiments and its specified levels are represented in Table 2.

Table 1. Factors and levels investigated in the robustness test.

Factors	Nominal	Levels investigated (-1; +1)
Shaken in ultrasonic bath (min)	10	8; 12
Mechanical Shaken (min)	10	8; 12
Wavelength (nm)	220	218; 222

Table 2. Plackett-Burman experimental design with the investigated factors.

Assay	Ultrasonic bath	Dummy	Dummy	Wavelength	Dummy	Mechanical shaken	Dummy
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

The effects of the factors on response were calculated according to the equation:

$$E_x = \frac{\sum Y(+)}{N/2} - \frac{\sum Y(-)}{N/2}$$

Where:

E_x = effects of the factor on response

$\sum Y(+)$ and $\sum Y(-)$ = sums of the responses

N = number of experiments of the design

The estimate error of the experiment was obtained according to the equation below:

$$E_e = \sqrt{\frac{\sum E^2 dummy}{n_{error}}}$$

Where:

E_e = experimental variability within the design

$\sum E^2 dummy$ = sum of squares of the n_{error} dummy

After calculate the effects of the factors and of the error of the experiment, the significance of the factors was determined in analysis through the accomplishment of the t-test statistic method according to the following equation:

$$t = \frac{Ex}{Ee}$$

Where:

Ex = effects of the factor on response

Ee = experimental variability within the experimental design

The t-calculated value was compared with t-theoretical bicaudal for $\alpha= 0.05$ and 10 degrees of freedom (gl).

RESULTS AND DISCUSSION

Selection and optimization of the espectrophotometric conditions

The spectrophotometric conditions were chosen after the test of different solvents such as water, methanol, acetonitrile, dichloromethane, chloroform, 0.1M HCl and 0.1M NaOH. The solubility of VLG and its absorption in the ultraviolet region were tested. The preparation of vildagliptin in water was chosen because of high absorption obtained with this solvent and also because it is a non-organic solvent and, therefore, non-toxic, inexpensive and easy disposal without polluting the environment.

UV absorption spectrum of VLG showed a maximum absorbance at 207 nm but the determination of the VLG was not possible by direct measurements of absorbance in zero-order spectra because the placebo solution interferes in the absorption spectra of VLG (Figure 2). Then, the determination of VLG was made at 220 nm, using second order derivatization, by zero-crossing method.

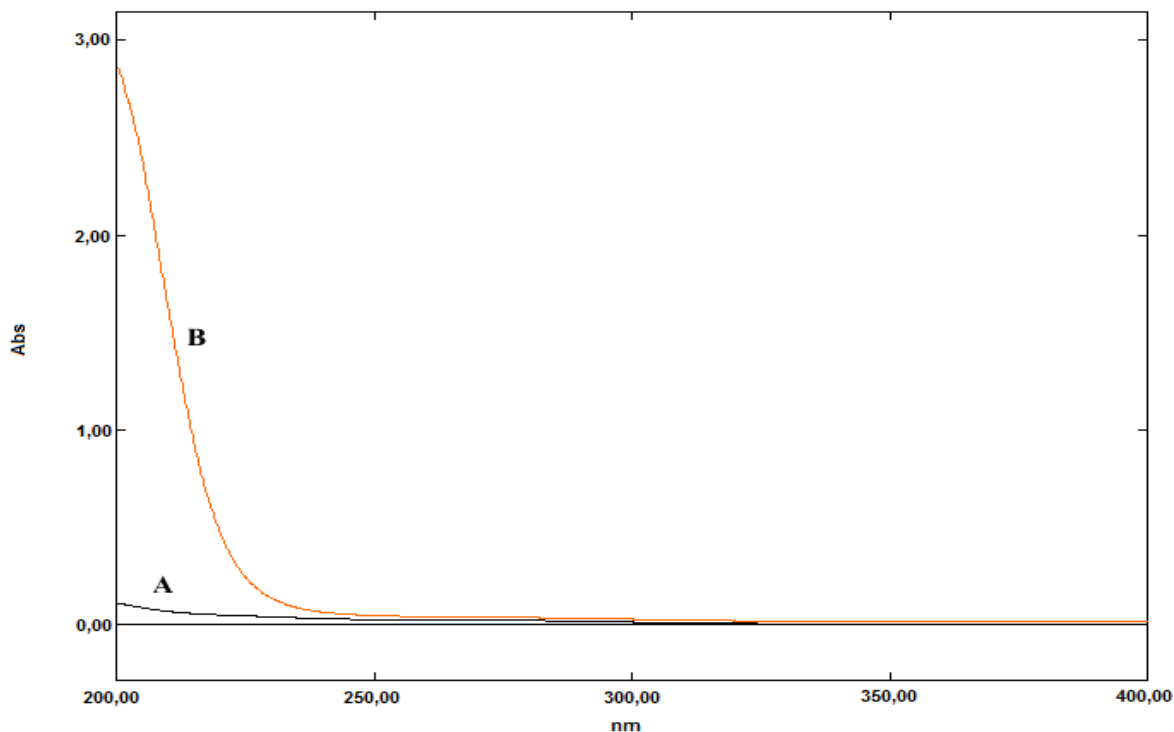


Figure 2. UV spectra to the placebo (A) and VLG (B) solutions (sobrepuesto) in the concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

The optimization of the derivative spectrum was based on the influence of the delta lambda and scaling factor with the objective of optimized the relation signal to noise ratio. The second order derivative spectrum of VLG showed sharper, better-defined peak of absorption and better signal to noise ratio when compared with the zero-order spectrum and other order derivative spectra (second-order) (Figure 3).

Therefore, derivative spectrophotometry shows more resolution and makes it possible to analyze the drug in presence of the excipients without any pretreatment.

The optimized conditions were validated for the analysis of VLG in order to quality control of the tablets in pharmaceutical dosage form.

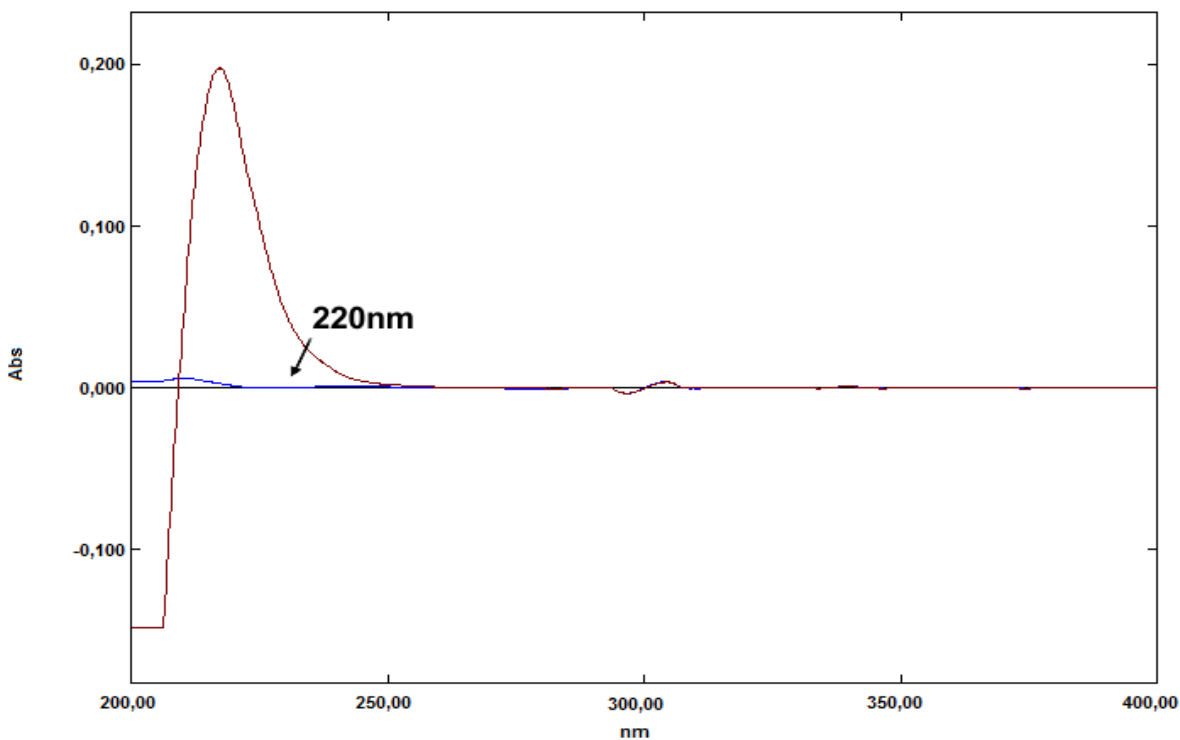


Figure 3. UV derivative spectra (second-order) obtained for the placebo and VLG solutions (sobreposition) in the concentration of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Therefore, derivative spectrophotometry shows more resolution and makes it possible to analyze the drug in presence of the excipients without any pretreatment.

The optimized conditions were validated for the analysis of VLG in order to quality control of the tablets in pharmaceutical dosage form.

Method validation

Linearity was observed over the concentration range of 25 to $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 220 nm with linearity equation $y = 0,0015x + 0,0033$ ($R^2 = 0,9997$), where x is the VLG concentration (expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$) and y is the amplitude from the peak at 220nm. The variance analysis ($P = 0,05$) was applied to verify the linearity of the method and the results showed that the regression equation was linear ($F_{\text{calculated}}$

= 38469.74 > Fcritical = 4.40) with no deviation from linearity (Fcalculated = 3.4 < Fcritical = 4.3).

The experimental values obtained for the determination of the precision of analytical method are presented in Table 3. The low relative standard deviation (RSD) obtained for the repeatability and intermediary precision showed the good precision of the method.

Table 3. Inter-day and between-analysts precision data for vildagliptin in samples of pharmaceutical formulation obtained by UV derivative method at 220 nm in the concentration of 100µg/mL.

Sample (n)	Repeatability			Intermediate precision
	Day 1	Day 2	Day 3*	
1	97.97	99.86	97.78	
2	99.47	97.16	97.78	97.42
3	97.78	97.99	96.51	
4	98.41	98.87	97.34	98.06
5	97.78	96.91	97.97	
6	99.04	97.55	97.15	98.41
Mean (%)	98.41	98.06	97.42	97.96
RSD	0.72	1.14	0.55	0.88

* Analyst B

The accuracy of the method ranged from 96.16 to 98.95% (RSD = 1.45). The results are shown in Table 4. These values showed the good accuracy of the purposed method.

Table 4. Accuracy in samples of pharmaceutical formulation.

Drug	Added Level ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Total Nominal Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mean Concentration found ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Accuracy (%)	RSD ^b (%)
Vildagliptin (95.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	25 (25%)	125.0	120.34	98.95	1.45
	50 (50%)	150.0	144.02	96.86	
	75 (75%)	175.0	167.72	96.16	

^aMean of three replicates^bRSD = relative standard deviation

The results of the experiments of the study of the robustness are presented in Table 5. They are expressed in percentage of the drug in relation to the nominal dose, calculated using standard solution in the nominal condition of the method.

Table 5. Responses (percentage of VLG in the commercial tablets relative to its label claimed concentration) obtained, in each assay, in relation to the standard solutions after changes in factors investigated by robustness test.

Experiment	Percentage of VLG (%)
1	98.65
2	98.88
3	99.09
4	96.69
5	96.91
6	97.69
7	98.69
8	97.91

The effects of the factors in analysis, the error estimated starting from the dummy factors and the value of t - calculated are showed in Table 6. The analysis of the results of the robustness study demonstrated that the factors in analysis didn't

present significant effect on the quantitation of VLG, indicating the robustness of the UV derivative spectrophotometric method.

Table 6. Experimental values of the effects and t-calculated of the factors analyzed.

Factor	 Effect 	t-calculated
Mechanically shaken	1.04	2.48 ^a
Shaken in ultrasonic bath	0.27	0.64 ^a
Wavelength of the detector	0.55	1.30 ^a

^aNo statistical difference to $t(0.05; 2)$; experimental error $Ee = 0.420$.

Comparison between HPLC Method and UV derivative spectrophotometric method

The Student's t-test was applied and does not reveal significant difference between the experimental values obtained in the sample analysis by the two methods. Table 7 shows that the calculated t-value and F-value was found to be less than the tabular values at 95% confidence limits. Thus, the developed and validated methods provided similar results for vildagliptin quantitation.

Table 7. Results obtained in the comparison of HPLC and UV derivative methods.

HPLC ($\mu\text{g/mL}$)	UV DERIVATIVE ($\mu\text{g/mL}$)	t-test
48.79 (97.58%)	98.60 (98.54%)	
48.66 (97.32%)	98.59 (98.14%)	
48.63 (97.26%)	97.75 (97.43%)	1.25 x 10 ⁻²⁰
48.94 (97.89%)	98.60 (98.21%)	
49.02 (98.05%)	97.75 (97.55%)	
49.00 (98.00%)	98.17 (97.91%)	

Tabular value for $t(0.05; 10) = 2.228$

CONCLUSION

The results indicated that the UV derivative spectrophotometric method was specific, linear, precise, accurate and robust. There is no significant difference between the previously validated HPLC method and UV derivative method, which confirm that the UV derivative method is adequate and useful to the routine quality control of VLG in pharmaceutical dosage form.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvidmentos Científico e Tecnológico) for the financial support.

REFERENCES

[1] Mathieu, C. The scientific evidence: vildagliptin and the benefits of islet enhancement. *Diabetes. Obes. Metab.*, 2009, 11(2), 9-17.

[2] Srinivasan, B.T.; Jarvis, J.; Khunti, K.; Davies, M.J. Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus: a review. *Postgrad. Med. J.*, 2008, 84, 524-531.

[3] Peres, D.S.; Ivanea, L.J.; Santos, M.A.; Comportamento alimentar em mulheres portadoras de diabetes tipo 2. *Revista de saúde pública.*, 2006, 40(2).

[4] Jost, M.M.; Lamerz, J.; Tammen, H.; Menzel, C.; De Meester, I.; Lambeir, A.M.; Augustyns, K.; Scharpe, S.; Zucht, H.D.; Rose, H.; Jurgens, M.; Schulz-Knappe, P.; Budde, P. In vivo profiling of DPP4 inhibitors reveals alterations in collagen metabolism and accumulation of an amyloid peptide in rat plasma. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 77, 228-237.

[5] Bolli, G.; Dotta, F.; Colin, L.; Minic, B.; Goodman, M. Comparison of vildagliptin and pioglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin. *Diabetes. Obes. Metab.*, 2009, 11, 589-595.

[6] Rojas, F.S.; Ojeda, C.B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008 A review. *Anal. Chim. Acta.*, 2009, 635, 22-44.

[7] ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Guideline on Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1 (R2). In: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 2003.

[8] ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2 (R1). In: *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 2005.

[9] Heyden, Y.V.; Nijhuis, A.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B.G.M.; Massart, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2001, 24, 723-753.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

Para obtenção de um produto farmacêutico adequado é necessário que o controle de qualidade esteja bem implementado na indústria farmacêutica de forma que o consumidor receba um produto em condições de uso adequadas e padronizadas.

Dessa forma, é muito importante que todo medicamento comercializado possua metodologia validada garantindo, assim, um controle de qualidade efetivo e confiável para determinação do fármaco na sua forma farmacêutica.

O desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de vildagliptina é requerido uma vez que não existe literatura científica analítica sobre o fármaco para que possa ser utilizada no controle de qualidade do medicamento.

Diante disso, este estudo visou desenvolver e validar métodos qualitativos e quantitativos para a análise de vildagliptina em comprimidos, avaliar a aplicabilidade destes métodos para os estudos de estabilidade, incluindo a determinação da cinética de degradação do fármaco frente à condição de estresse, e realizar a análise comparativa dos dois métodos validados.

Inicialmente foram realizados testes para caracterizar e identificar a VLG substância de referência visando o seu uso como padrão. Dentre esses testes estão: solubilidade, IV, DSC, faixa e ponto de fusão e RMN de H. Estes testes foram efetuados de forma satisfatória permitindo adequada caracterização da SQR que foi utilizada.

As análises por CCD, CLAE e UV permitiram a identificação, de forma segura, de vildagliptina na forma farmacêutica comprimidos.

A validação de método por CLAE, com a utilização de condições normais de coluna (C8) e detector (UV/DAD) permitiu a análise qualitativa e quantitativa do fármaco de maneira rápida e eficiente. Além disso, a exposição do fármaco a fatores de estresse possibilitou a elucidação de fatores aos quais a molécula é susceptível. O fármaco demonstrou ser sensível à hidrólise básica, à oxidação e à temperatura. A eluição em diferentes tempos de retenção, do fármaco e dos seus produtos de degradação, garante a característica de método indicador de estabilidade, sendo essencial para estudos futuros de isolamento e identificação de produtos de

degradação do fármaco, visando à manutenção da eficácia e segurança do produto farmacêutico.

A utilização da espectrometria de massas gerou informações importantes, onde foi possível sugerir a possível estrutura química do produto de degradação majoritário formado nas três condições de estresse testadas: alcalina, oxidativa e térmica. Porém, o isolamento e a análise por ressonância magnética nuclear necessitam ser realizados para confirmação.

A determinação da cinética de degradação em condições básicas foi definida como de primeira ordem permitindo prever o grau de transformação ocorrido durante o período do estudo. A alta velocidade de degradação do fármaco em solução permitiu detectar a acentuada labilidade em condições básicas.

A validação do método por espectrofotometria na região do UV derivada permitiu a determinação quantitativa de uma maneira rápida e precisa, de extrema importância para o controle de qualidade de rotina de vildagliptina nos comprimidos.

Os métodos propostos neste trabalho para quantificação de vildagliptina em comprimidos foram comparados estatisticamente, através do Teste *t* de *Student* presumindo variâncias equivalentes. O resultado demonstrou que não ocorreram diferenças significativas entre os mesmos e, dessa forma, estes métodos podem ser considerados intercambiáveis.

Como continuação desse trabalho, pretende-se trabalhar com os seguintes objetivos:

- Desenvolver e validar método analítico através de CLAE, com detecção por espectrometria de massas (EM), para avaliação de comprimidos revestidos contendo vildagliptina e metformina;

- Desenvolver e validar método analítico através de EC, com detecção UV, para avaliação de comprimidos contendo vildagliptina;

- Desenvolver e validar método analítico através de EC/EM/EM para avaliação de comprimidos revestidos contendo vildagliptina e metformina e para avaliação de comprimidos contendo vildagliptina;

- Comparar a efetividade dos métodos analíticos desenvolvidos na análise quantitativa de vildagliptina e, também de vildagliptina e metformina em comprimidos;

- Desenvolver e validar o método de dissolução de comprimidos revestidos de vildagliptina e metformina e de comprimidos de vildagliptina;

- Realizar o isolamento e identificação dos possíveis produtos de degradação.