

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE *IN VITRO* DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA SITAGLIPTINA E
VILDAGLIPTINA**

CAMILA FERRAZZA ALVES GIORDANI

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Coorientador: Prof^a. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Porto Alegre, 2018.

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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE *IN VITRO* DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA SITAGLIPTINA E
VILDAGLIPTINA**

Tese apresentada por Camila Ferrazza Alves
Giordani para obtenção do GRAU DE DOUTORA
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Coorientador: Prof^a. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Porto Alegre, 2018.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de março de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Patrícia Gomes

Universidade Franciscana

Profa. Dr. Sabrina Nascimento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Giordani, Camila Ferrazza Alves
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE IN VITRO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA
SITAGLIPTINA E VILDAGLIPTINA / Camila Ferrazza Alves
Giordani. -- 2018.

189 f.

Orientador: Martin Steppe.

Coorientadora: Elfrides E. S. Schapoval.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2018.

1. Impurezas de fármacos. 2. Sitagliptina. 3.
Vildagliptina. 4. Cromatografia líquida. I. Steppe,
Martin, orient. II. Schapoval, Elfrides E. S.,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, esta tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações, visando uma melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Revisão bibliográfica;
- Capítulo I: caracterização das substâncias químicas de referência das impurezas da sitagliptina e vildagliptina;
- Capítulo II: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa de impurezas orgânicas da sitagliptina – Encarte de publicação;
- Capítulo III: desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa de impurezas orgânicas da vildagliptina – Encarte de publicação;
- Capítulo IV: avaliação da toxicidade – Encarte de publicação;
- Discussão Geral;
- Conclusões;
- Referências.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Martin Steppe e Elfrides E. S. Schapoval pelo acolhimento recebido, orientação, dedicação e confiança demonstrada durante o desenvolvimento desse trabalho. Sou muito grata pelos seus ensinamentos e gostaria de parabenizar o trabalho que desenvolvem e a dedicação que tens pela grande família do Laboratório de Controle de Qualidade.

Aos professores Andreas S. L. Mendez, Cássia V. Garcia, Nádia M. Volpato e Tércio Oppe pelo auxílio e disposição em sempre colaborar.

Aos amigos do Laboratório pela amizade e conhecimentos adquiridos. Em especial a Sarah Campanharo pela colaboração e dedicação na execução desse trabalho.

A Nathalie Wingert pela colaboração no desenvolvimento dos estudos de robustez e toxicidade, pelo aprendizado durante as discussões científicas além da parceria e disponibilidade em ajudar sempre que precisava.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico pelo auxílio durante a realização dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Química Analítica coordenado pelo professor Érico Marlon de Moraes Flores da Universidade Federal de Santa Maria pela disponibilidade em realizar os ensaios analíticos no CLUE. Em especial a Gabrielle Dineck Iop pelos conhecimentos compartilhados e também pelo auxílio nesta pesquisa.

Ao Laboratório de Avaliações Toxicológicas coordenado pela professora Solange Cristina Garcia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Marcelo Arbo pelo auxílio nos experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade.

Aos membros da banca pela disposição e colaboração em melhorar a qualidade deste trabalho.

À minha irmã Cássia pelo apoio, amor e companheirismo.

Aos meus pais Lucí e Rubens pela educação prestada, apoio, amor, dedicação e auxílio no que fosse preciso.

Ao meu querido e amado esposo Jessye por acreditar na minha capacidade e incentivar sempre meu aperfeiçoamento na carreira acadêmica. Pela dedicação, apoio e suporte no que fosse necessário para conquistar meus objetivos.

À minha preciosidade, minha filha Alice, pela alegria e compreensão em abdicar sua vontade de sempre brincar comigo para que pudesse realizar o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação desta Faculdade pelas condições de trabalho oferecidas. Ao serviço da secretaria deste Programa sempre disponível em auxiliar.

A CAPES e ao CNPQ pelos suportes financeiros.

RESUMO

A avaliação no perfil das impurezas de fármacos está sendo alvo de atenção das agências regulatórias nacionais e internacionais visto que podem gerar implicações na saúde da população. Frente a isso, as indústrias farmacêuticas devem adequar-se às novas regulamentações para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. O fosfato de sitagliptina (STG) e vildagliptina (VLG), liberados para uso clínico no Brasil em 2006 e 2007, respectivamente, são utilizados para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2. Na literatura pesquisada não foram encontrados relatos referentes à determinação quantitativa de impurezas de síntese da vildagliptina e sitagliptina. Desta forma, este trabalho teve por objetivo desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de impurezas dos fármacos sitagliptina e vildagliptina, além de avaliar a toxicidade dos mesmos. Foi desenvolvido e validado método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do fosfato de sitagliptina na presença de duas impurezas de síntese de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação. Para tanto, foi utilizada coluna cromatográfica XBridge™ Pheny (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), vazão 1,0 mL/min e detecção em 207 nm. A fase móvel foi composta por acetonitrila: solução aquosa em 0,05% de ácido fórmico (40:60, v/v). A determinação quantitativa da vildagliptina e duas impurezas de síntese foi desenvolvida e validada utilizando a técnica por cromatografia líquida de ultra-eficiência. A coluna cromatográfica utilizada corresponde ACQUITY UPLC® BEH C8 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção de 1 µL e temperatura de 35°C. A fase móvel foi composta por metanol em ácido fórmico 0,1%: solução aquosa em ácido fórmico 0,1%. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que estes estão de acordo com os requisitos preconizados pelos códigos oficiais. Esta pesquisa também apresenta resultados referentes aos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade tanto dos fármacos quanto das respectivas impurezas realizados a partir dos ensaios de MTT, vermelho neutro, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, potencial de membrana mitocondrial e teste cometa.

Palavras-chave: vildagliptina, sitagliptina, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida de ultra-eficiência, impurezas, validação, toxicidade.

ABSTRACT

Impurities profiling have attention of national and international regulatory agencies as they may generate implications for the health of the population. Against this, pharmaceutical industry must be suitable for new regulations to ensure quality, safety and efficacy of medicines. The phosphate sitagliptin and vildagliptin, released for clinical use in Brazil in 2006 and 2007, respectively, and used for the treatment of diabetes mellitus type 2. In the literature, we not found any reports regarding the quantitative determination of impurities synthesis of vildagliptin and sitagliptin. Thus, this study aimed to develop and validate analytical methods for the determination of impurities of sitagliptin and vildagliptin in addition to performing toxicological tests. It was developed and validated an analytical method by high-performance liquid chromatography for determination of sitagliptin in presence of two impurities synthesis according to the specific parameters, linearity, precision, accuracy, robustness, limits of detection and quantification. The XBridge™ Phenyl column (250 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm), flow rate 1.0 mL/min and detection at 207 nm. The mobile phase was composed of acetonitrile: aqueous solution in 0.05% formic acid (40:60, v/v). The results obtained are in accordance with the requirements recommended by official guides. Quantitative determination of vildagliptin and its synthetic impurities was developed using liquid chromatography ultra efficiency. The chromatographic column ACQUITY UPLC® BEH C8 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) was used, flow rate 0.3 mL/min, injection volume 1 µL and temperature 35 °C. The mobile phase is composed of methanol in formic acid 0.1%: aqueous solution in formic acid 0.1%. This research presents results for the cytotoxicity and genotoxicity studies of both drugs and the impurities.

Keywords: vildagliptin, sitagliptin, high performance liquid chromatography, ultra performance liquid chromatography, drug impurities, validation, cytotoxicity, genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Ações fisiológicas do GLP-1 em diferentes tecidos/órgãos.....	46
Figura 3.2. Degradação do GLP-1 pela DDP-4.....	46
Figura 3.3. Estrutura química da sitagliptina.....	47
Figura 3.4. Estrutura química do produto de degradação da sitagliptina.....	49
Figura 3.5. Estrutura química da vildagliptina.....	51
Figura 3.6. Estrutura química do produto de degradação majoritário.....	52
Figura 4.1 Estrutura química dos fármacos e das impurezas.....	67
Figura 4.2. Curva de DSC das impurezas 1 e 2 da sitagliptina SQR.....	68
Figura 4.3. Curva de DSC das impurezas 3 e 4 da vildagliptina SQR.....	69
Figura 4.4. Espectro de absorção na região do infravermelho das impurezas 1 e 2 da sitagliptina SQR.....	70
Figura 4.5. Espectro de absorção na região do infravermelho das impurezas 3 e 4 da vildagliptina SQR.....	71
Figura 4.6. Espectro de absorção na região do ultravioleta das impurezas 1 e 2 da sitagliptina.....	73
Figura 4.7. Espectro de absorção na região do ultravioleta das impurezas 3 e 4 da vildagliptina.....	74
Figura 4.8. Espectro de massas da sitagliptina SQR.....	75
Figura 4.9. Espectro de massas das impurezas 1 e 2 da sitagliptina SQR.....	76
Figura 4.10. Espectro de massas da vildagliptina SQR.....	77
Figura 4.18. Espectro de massas das impurezas 3 e 4 da vildagliptina SQR.....	77
Figure 1. Structures of sitagliptin, impurity 1 and impurity 2.....	89
Figure 2. Chromatogram of simulated excipient mixture; standard preparation of impurity 1, impurity 2 and sitagliptin with simulated excipient mixture; standard preparation of impurity 1 and impurity 2; standard preparation of sitagliptin.....	91

Figure 3. Chromatogram of standard preparation of impurity 1, impurity 2 and sitagliptin in presence of mais degradation product.....	91
Figure 4. Effect of variations on the analytical method	95
Figure 5. Evaluation of the effect of variations on the analytical method.	96
Figure 6. Evaluation of the effect of pre-defined variations on the analytical method	96
Figure 1. Chemical structures of VLG (a), impurity 1 (b) and impurity 2 (c).	115
Figure 2. (a) Effect of variations of VLG and impurities assay. (b) Effect of variations for the VLG and impurities areas. (c) Effect of VLG and impurities retention time...	121
Figure 3. Response surface plot of VLG, impurity 1 and impurity 2.....	123
Figure 4. VLG area (R2=0.99; Q2=0.43), impurity 1 (IMP1) area (R2=0.99; Q2=0.43), impurity 2 (IMP2) area (R2=0.99; Q2=0.43), RT (retention time) VLG (R2=0.99; Q2=0,43), RT IMP1 (R2=0.99; Q2=0.44), RT IMP2 (R2=0.99; Q2=0.44), assay VLG (R2=0.81; Q2=0,51), assay IMP1 (R2=0.89; Q2=0.25), assay IMP2 (R2=0.77; Q2=0.25).....	124
Figure 5. [1] Mass chromatogram of a standard preparation of impurity 1 (a), impurity 2 (b) and VLG (c) of extracted ion and chromatogram of impurity 1 (a), impurity 2 (b) and VLG (c) with simulated excipient mixture; [2] Chromatogram of simulated excipient mixture with selection of exact ion of impurity 1 (a), impurity 2 (b) and VLG (c).	125
Figure 1. Cell viability evaluated by the MTT reduction assays in 3T3 cells	145
Figure 2. Cell viability evaluated by the neutral red uptake in 3T3 cells.....	146
Figure 3. Results of the evaluation of reactive oxygen and nitrogen species in 3T3 cells after incubation with DCFH-DA.....	147
Figure 4. Evaluation of nitric oxide levels in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities	147
Figure 5. Evaluation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities.....	148
Figure 6. DNA damage in alkaline comet assay in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities	149

Figure 7. DNA damage in LMW DNA diffusion assay in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities.....149

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas..	33
Tabela 3.2. Classificação das impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico com resultados de ações de controle..	40
Tabela 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção das impurezas 1 e 2 da sitagliptina e suas respectivas atribuições.	70
Tabela 4.2. Frequências de absorção das principais bandas de absorção das impurezas 3 e 4 da vildagliptina e suas respectivas atribuições.....	72
Table 1. Limits of detection, quantification and relative standard deviation of impurities 1 and 2. Linearity of sitagliptin and its impurities.	92
Table 2. Data intraday and interday precision and data on accuracy..	94
Table 3. Data of system suitability.	97
Table 1 Limits of detection and quantification of VLG, impurities 1 and 2. Linearity of VLG, impurity 1 and impurity 2	126
Table 2. Data of intraday, interday precision and accuracy	127

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1. Aspectos gerais	29
3.2. Impureza de fármacos	30
3.3. Ensaio de citotoxicidade	33
3.3.1. Células 3T3.....	36
3.4. Ensaio de genotoxicidade.....	37
3.4.1. Impurezas genotóxicas	39
3.5. Diabetes Mellitus	42
3.6. Fármacos hipoglicemiantes	44
3.6.1 Sitagliptina	47
3.6.2 Vildagliptina	51
3.6.3. 3-amino-1-adamantanol.....	54
3.7. Métodos analíticos.....	55
3.7.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	55
3.7.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência.....	57
3.7.3. Espectrometria de massas	60
4. CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA DAS IMPUREZAS DA SITAGLIPTINA E VILDAGLIPTINA	63
4.1. Introdução.....	65
4.2. Substâncias químicas de trabalho	66
4.3. Parte experimental.....	67

4.3.1. Caracterização das SQRs impurezas 1 e 2 da sitagliptina e impurezas 3 e 4 da vildagliptina	67
4.3.1.1 Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura.	67
4.3.1.1.1 Resultados e discussão	68
4.3.1.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	69
4.3.1.2.1. Resultados e discussão	69
4.3.1.3. Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	73
4.3.1.3.1. Resultados e discussão	73
4.3.1.4. Espectrometria de massas	75
4.3.1.4.1. Resultados e discussão	75
4.4. Conclusões	78
5. CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA SITAGLIPTINA	79
5.1. Introdução	81
5.2. Artigo científico I	83
6. CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA VILDAGLIPTINA	105
6.1. Introdução.....	107
6.2. Artigo científico II	109
7. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	131
7.1. Introdução.....	133
7.2. Artigo científico III	135
8. DISCUSSÃO GERAL	157
9. CONCLUSÕES	169
10. REFERÊNCIAS	173

INTRODUÇÃO

O controle e a avaliação de impurezas nos insumos empregados pela indústria farmacêutica são fundamentais para a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos desenvolvidos. O estabelecimento do perfil das impurezas através da identificação e quantificação está recebendo importante atenção por parte das autoridades reguladoras, onde diferentes farmacopeias têm incorporado os limites com relação aos níveis permissíveis de impurezas presentes no medicamento (ROY, 2002).

A presença das impurezas pode representar inúmeras implicações para a saúde da população como potenciais efeitos teratogênicos, mutagênicos ou também carcinogênicos (BALASUBRAHMANYAM et al., 2012a). Desta forma, estudar o potencial genotóxico destas substâncias torna-se necessário. Adicionalmente, a correta seleção das metodologias analíticas é essencial e deve ser sensível o suficiente para medir pequenas quantidades das impurezas (BALASUBRAHMANYAM et al., 2012b).

O uso contínuo de medicamentos tem sido alvo de estudos relacionados à presença de impurezas e produtos de degradação, avaliação da estabilidade, citotoxicidade e genotoxicidade. Sabendo que o paciente necessita de tratamento que auxilie no restabelecimento da saúde e melhora na qualidade de vida, qualquer comprometimento na qualidade do medicamento interfere no sucesso da terapia. Assim sendo, é necessário o desenvolvimento de métodos que possam contribuir para o aprimoramento do controle da qualidade, da segurança e da eficácia dos mesmos visando identificar e quantificar, quando presentes, impurezas que possam influenciar na terapia e na condição de saúde destes pacientes.

Dentre as doenças que necessitam de tratamento por um extenso período de tempo, destaca-se o *diabetes mellitus* tipo 2 que, devido à complexa fisiopatologia exige da farmacoterapia uma combinação de medicamentos que sejam capazes de manter os níveis basais de glicose no sangue. Diretrizes clínicas monitoram a necessidade de modificações no tratamento quando a terapêutica não está sendo alcançada, visando melhora na resposta clínica do paciente (NEUMILLER e SETTER, 2012).

Atualmente, a classe das gliptinas, que incluem a sitagliptina e a vildagliptina está sendo utilizada para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2. Por serem medicamentos recentes, poucos estudos foram realizados referentes à avaliação e quantificação de impurezas presentes nestes fármacos. Seu mecanismo de ação baseia-se em inibir a enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), que melhora a ação das incretinas mantendo os níveis de glicose dentro da normalidade (NEUMILLER e SETTER, 2012).

Tendo em vista o reduzido número de dados referentes à presença, identificação e quantificação, bem como quanto ao potencial toxicológico das impurezas relacionadas a estas gliptinas e por representarem um consumo substancial na terapêutica atual, o desenvolvimento e investigação de métodos analíticos e investigação da toxicidade constitui contribuição relevante para garantir a confiabilidade e segurança no uso crônico destes medicamentos e tratamento eficaz do *diabetes mellitus* tipo 2.

O presente trabalho está baseado nestes propósitos e objetiva subsidiar o controle de qualidade no estabelecimento de métodos confiáveis para identificação, determinação quantitativa e avaliação da toxicidade referente às impurezas orgânicas dos fármacos fosfato de sitagliptina e vildagliptina.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos que viabilizem a identificação, caracterização e determinação quantitativa de impurezas orgânicas dos fármacos sitagliptina e vildagliptina, bem como avaliar sua toxicidade.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as substâncias químicas de referência por meio de técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectrofotométricas;
- Desenvolver métodos analíticos para análise do perfil de impurezas da sitagliptina e vildagliptina;
- Validar os métodos analíticos para detecção e quantificação das impurezas de síntese da vildagliptina e sitagliptina;
- Realizar estudos *in vitro* de citotoxicidade e genotoxicidade das impurezas da sitagliptina e vildagliptina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ASPECTOS GERAIS

As formulações dos medicamentos possuem ingredientes ativos e inativos, sendo que o fármaco é o responsável pela ação farmacológica. Este pode apresentar-se na sua forma não completamente pura, onde a presença de impurezas em concentração acima do aceitável compromete na segurança e eficácia do tratamento medicamentoso (NAGPAL et al., 2011; HOLM e ELDER, 2016).

Durante a síntese de novos compostos, as chances da presença de impurezas são significativas, pois esse processo ocorre a partir de materiais de partida, solventes, intermediários e sub-produtos. Nestes casos, os materiais de partida geralmente apresentam especificações de pureza inferiores quando comparados às substâncias farmacológicas. Portanto, devido ao grande número de materiais envolvidos, a pureza durante o processo de síntese pode estar comprometida (AHUJA, 2007).

Os materiais de partida utilizados para a síntese de matérias-primas também podem ser oriundos a partir de diferentes rotas ou fontes sintéticas e, dependendo do fabricante, podem gerar diferentes perfis de impurezas. Assim sendo, a partir do conhecimento das rotas potenciais, podem-se desenvolver métodos que vizem o controle dessas impurezas. (ARGENTINE et. al., 2007; ALSANTE et. al., 2014).

Adicionalmente, os solventes utilizados também podem conter impurezas em quantidades variadas, sendo que sua interação com os demais produtos utilizados podem gerar outras impurezas (AHUJA, 2007).

Os excipientes empregados durante a formulação também podem gerar impurezas. A ampla variedade de condições na qual o fármaco passa durante o processo de formulação pode comprometer a qualidade levando à degradação. Por exemplo, o calor compromete substâncias termossensíveis, soluções e suspensões podem levar à hidrólise ou solvólise, bem como a oxidação e reações fotoquímicas (AHUJA, 2007).

A qualidade dos excipientes, o desenvolvimento da formulação, o processo e fabricação, e a correta seleção de embalagens também influenciam na qualidade e segurança do produto final, diminuindo a probabilidade da presença de impurezas (HOLM e ELDER, 2016).

As etapas durante a produção de medicamentos, bem como alterações neste processo podem comprometer a qualidade do produto final, já que estas resultam da ampla diversidade de variáveis existentes (CUI et al., 2012).

Nessas situações, é importante identificar estratégias capazes de controlar as possíveis alterações químicas e físicas dos ativos e produtos farmacêuticos durante o processo de desenvolvimento, visto que essas modificações afetam a eficácia e segurança dos medicamentos (ALSANTE et al., 2014).

Desta forma, a avaliação das mudanças durante o desenvolvimento que formam impurezas contribui para a segurança e auxiliam nas pesquisas de tratamentos inovadores sem comprometer a qualidade do produto final (ALSANTE et al., 2014).

3.2. IMPUREZAS DE FÁRMACOS

O perfil farmacológico e toxicológico é responsável pelos efeitos adversos e pela segurança, respectivamente, que também podem estar relacionados a presença de impurezas. É necessário o monitoramento e controle das impurezas para garantir qualidade e segurança de um medicamento sendo que as atividades analíticas representam componente chave na análise farmacêutica moderna (JAIN e BASNIWAL, 2013).

As impurezas em produtos farmacêuticos correspondem às substâncias químicas indesejáveis que permanecem nos insumos ativos, ou que são produzidas durante a formulação e também mediante o envelhecimento (ROY, 2002; NAGPAL et al, 2011).

Quando um novo processo é desenvolvido, as matérias-primas, os intermediários, os reagentes ou solventes podem reagir entre si gerando subprodutos ou impurezas do processo (BALASUBRAHMANYAM et al., 2012a). A presença destes materiais indesejados, mesmo que em pequenas quantidades, pode comprometer a eficácia e segurança dos produtos farmacêuticos (ROY, 2002; NAGPAL et al, 2011; BALASUBRAHMANYAM et al., 2012b).

Vários fatores podem influenciar na presença de impurezas, tais como: a estereoquímica do ativo, dado que os enantiômeros podem apresentar diferenças na farmacologia e toxicologia; a cristalização dos compostos ativos, que podem alterar suas propriedades; a presença de polimorfos, que diferem nas suas propriedades

físicas alterando também o comportamento biofarmacêutico. Adicionalmente, diferentes grupos funcionais podem sofrer reações gerando impurezas e produtos de degradação, dentre eles, grupamento éster pode ser suscetível à hidrólise, grupos hidroxila na presença de compostos aromáticos estão sujeitos à degradação oxidativa, também estão presentes a fotoxidação, fotólise e aquecimento como outros exemplos (NAGPAL et al, 2011).

Desta forma, as agências regulatórias e sanitárias estão cada vez mais atentas para esse assunto e vem buscando diferentes estratégias no intuito de garantir a qualidade e segurança das preparações farmacêuticas (ICH-Q3A(R2), 2006; ICH-Q3B(R2), 2006; BRASIL, 2015).

O guia Q3A(R2) do *International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) fornece orientações sobre o conteúdo e qualificação de impurezas em novos fármacos sintetizados quimicamente. O guia Q3B(R2) informa sobre impurezas em novos medicamentos produzidos a partir de síntese química (ICH-Q3A(R2), 2006; ICH-Q3B(R2), 2006).

Segundo o ICH, as impurezas podem ser classificadas em três categorias: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e solventes residuais. As impurezas orgânicas podem surgir durante o desenvolvimento ou armazenamento, sendo que estas incluem os materiais de partida, sub-produtos, intermediários, produtos de degradação, reagentes, ligantes e catalisadores (ICH-Q3A(R2), 2006).

As impurezas inorgânicas são resultados do processo de desenvolvimento e incluem reagentes, ligantes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos ou outros materiais (ICH-Q3A(R2), 2006).

Os solventes correspondem aos líquidos orgânicos ou inorgânicos usados como veículo para preparo de soluções ou suspensões durante a síntese de um novo composto (ICH-Q3A(R2), 2006). Estes são divididos em três categorias, sendo que os pertencentes à classe 1 (benzeno, tetracloreto de carbono, 1,2 dicloroetano, 1,1 dicloroetano, 1,1,1 tricloroetano) correspondem aos solventes tóxicos que devem ser evitados. Caso seu uso seja inevitável, deve ser utilizado de acordo com os níveis permissíveis pelos guias regulatórios (NAGPAL et al, 2011).

A classe 2 (acetonitrila, clorobenzeno, clorofórmio, cicloexano, diclorometano, formamida, hexano, metanol, tolueno, entre outros exemplos) corresponde aos solventes que devem ser de uso limitado devido a sua toxicidade inerente. Na classe 3

(ácido acético, acetona, anisol, etanol, ácido fórmico, acetato de metila, dimetilsulfóxido, entre outros exemplos) estão presentes os solventes com baixo potencial tóxico (NAGPAL et al, 2011).

A presença de impurezas enantioméricas deve ser cuidadosamente monitorada, visto que podem apresentar diferenças nos perfis farmacológicos e toxicológicos (AHUJA, 2007; BALASUBRAHMANYAM et al., 2012a). Estas impurezas podem interagir com diferentes alvos quirais como receptores, enzimas e canais iônicos podendo apresentar alguma atividade de interesse, atuar como antagonista, possuir atividade distinta da terapêutica e até mesmo efeitos adversos (AGRANAT et al., 2002).

De acordo com as especificações do ICH, não é necessária identificação de impurezas que estejam abaixo do nível de 0,1%, somente no caso destas apresentarem atividade ou serem tóxicas (ICH-Q3A(R2), 2006).

Se a dose máxima diária ingerida for menor ou igual a 2g e o limite de impurezas encontrado for de 0,05%, não é necessário fazer a identificação e qualificação destas impurezas, sendo que a identificação é feita somente quando o limite de impurezas for de 0,1%, ou se a dose diária resultar em 1mg da impureza. Com relação à qualificação das impurezas, é necessário que estas superem o limite de 0,15% ou a ingestão diária ser de 1mg (ICH-Q3A(R2), 2006).

Para doses diárias acima de 2g, não é necessário a identificação e qualificação das impurezas se estas forem encontradas em um limite de até 0,03%. Caso contrário, deve-se realizar a identificação e qualificação das impurezas encontradas, bem como sua toxicidade deve ser estudada mediante testes específicos (ICH-Q3A(R2), 2006). A Tabela 3.1 ilustra os limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas, de acordo com as especificações do ICH.

Tabela 3.1 Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas (ICH-Q3A(R2), 2006).

Dose máxima	Limite de	Limite de identificação ³	Limite de qualificação ³
-------------	-----------	--------------------------------------	-------------------------------------

diária ¹	notificação ^{2,3}		
≤ 2g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)	0,15% ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)
> 2g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

¹Quantidade máxima da substância ativa administrada por dia;

²Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados;

³Limites menores podem ser apropriados se a impureza for usualmente não tóxica.

Em dezembro de 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos (BRASIL, 2015).

Portanto, percebe-se que o Brasil está buscando atualizar-se neste assunto de acordo com os guias e regulamentações internacionais disponíveis atualmente, no intuito de auxiliar as pesquisas e o controle de qualidade neste campo.

3.3. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Ensaio *in vitro* de citotoxicidade e viabilidade celular são úteis para prever a toxicidade aguda de compostos baseado no número de células, morfologia e atividade metabólica (POHJALA, et al., 2007). Estes testes podem ser utilizados para prever a toxicidade humana dos produtos químicos, porém, os ensaios podem gerar resultados diferentes dependendo do teste a ser realizado (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Alguns dos ensaios utilizados para avaliar a toxicidade correspondem ao MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazolio), LDH (lactato desidrogenase), vermelho neutro, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, óxido nítrico e potencial de membrana mitocondrial.

O ensaio de redução do MTT (sal de tetrazólio solúvel em água) avalia a atividade da succinato desidrogenase que está presente no interior da membrana mitocondrial, sendo este um indicador da atividade metabólica das mitocôndrias que avalia a viabilidade celular (ARBO et al., 2014). Neste ensaio, mede-se a formação do formazan através da redução do anel de tetrazólio do MTT (LOBNER, 2000). Este produto formado é impermeável às membranas celulares, acumulando-se nas células saudáveis (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Um dos parâmetros que também avalia a morte celular é a avaliação da integridade da membrana das células, a qual pode ser medida pela atividade da enzima citoplasmática que é liberada quando a célula é danificada (WEYERMANN et al., 2005). A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citoplasmática expressa na maioria das células de mamíferos. Desta forma, seu ensaio é útil para avaliar a integridade da membrana através da sua quantificação no meio extracelular, já que o extravasamento do meio intracelular é um indicador de dano celular irreversível (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006; POHJALA, et al., 2007).

O ensaio do vermelho neutro avalia a capacidade das células viáveis em incorporar o corante catiônico que penetra nas células através da difusão não-iônica sendo acumulado pelos lisossomos por meio da interação dos sítios aniônicos na matriz lisossomal. Desta forma, qualquer dano aos lisossomos diminui a acumulação celular do corante (ARBO et al., 2014). Por quantificar o número de células viáveis não lesadas após exposição a substâncias tóxicas, pesquisadores verificaram que a quantificação do corante extraído mostrou-se linear em relação ao número destas quando realizaram contagem direta ou por determinar proteínas nas populações celulares (WEYERMANN et al., 2005).

Os ensaios de viabilidade celular são realizados a partir de variadas metodologias. Desta forma, pesquisadores compararam dois ensaios (MTT e LDH) e encontraram resultados diferentes avaliando a toxicidade do cloreto de cádmio, observando que o ensaio do MTT mostrou-se mais sensível apresentando toxicidade antes de qualquer efeito no resultado do ensaio de LDH (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Estas variações nos resultados podem ocorrer, já que os ensaios de citotoxicidade desenvolvidos utilizam diferentes parâmetros associados à morte e proliferação celular (WEYERMANN et al., 2005).

Outra maneira de avaliar a toxicidade é a partir do óxido nítrico. Este desempenha funções fisiológicas no organismo humano, mas também pode comprometer estas ações dependendo da quantidade presente, sendo classificado em efeitos diretos e indiretos (GRISHAM et al., 1999).

Nos efeitos diretos, o óxido nítrico interage diretamente com moléculas ou alvos biológicos e os níveis desta substância estão em baixa concentração correspondendo as ações fisiológicas e auxiliando em funções reguladoras que incluem vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão, aprendizagem e formação da

memória, atividades antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias (GRISHAM et al., 1999; TATSCH et al., 2011).

Nos efeitos indiretos, os níveis do óxido nítrico estão aumentados e este reage com espécies de oxigênio e oxihemoglobina formando produtos como nitrito e nitrato. Essas espécies reativas formadas podem danificar o DNA, inibir enzimas e iniciar a peroxidação lipídica. O óxido nítrico também está presente em processos inflamatórios tais como artrite, hepatite, doença inflamatória intestinal, septicemia, choque hemorrágico e em doenças autoimunes. (GRISHAM et al., 1999; TATSCH et al., 2011).

O óxido nítrico possui uma meia-vida curta, portanto, sua determinação tem sido realizada a partir do seu produto final que é estável (nitrito/nitrato). Dentre os ensaios existentes para esta quantificação, o método de Griess é considerado rápido, fácil, de baixo custo e mais sensível, sendo amplamente utilizado para monitorar processo inflamatório, estresse oxidativo e disfunção endotelial (TATSCH et al., 2011).

Além do óxido nítrico, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio influenciam na toxicidade e podem gerar mutações no DNA, inativação proteica e morte celular (BARTOSZ, 2009). O estresse oxidativo influencia na patogênese de doenças como aterosclerose, diabetes, hipertensão e câncer. Em relação ao diabetes, a produção de espécies reativas compromete a glicosidação de açúcares. Níveis elevados de glicose estimulam a formação dos produtos finais da glicação avançada que interagem com seu receptor contribuindo para a geração de espécies reativas (BARTOSZ, 2009).

A avaliação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode ser realizada utilizando 2-7-diacetato-dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH-DA), que é uma forma reduzida da fluoresceína e não fluorescente. Após sofrer hidrólise enzimática pelas esterases celulares em diclorodihidrofluoresceína (DCFH), este sofre oxidação pelas espécies reativas e o produto final corresponde a um composto fluorescente (DCF) utilizado para monitorar o estresse reativo (BARBOSA et al., 2014).

Da mesma forma, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial contribui na avaliação da toxicidade. As mitocôndrias podem sofrer apoptose através da dissipação do potencial de membrana interno e este desempenha funções fisiológicas durante a cadeia respiratória. Uma perda significativa no potencial de membrana compromete a fosforilação oxidativa que restringe a energia celular com posterior liberação de fatores apoptóticos ocasionando a morte celular (SILVA et al., 2013).

O ensaio com etil ester tetrametilrodamina (TMRE) é utilizado para avaliar o potencial de membrana mitocondrial. Este composto é um corante fluorescente às células e se acumula nas membranas viáveis (SILVA et al., 2013).

Com o objetivo de avaliar a toxicidade do mesilato de gemifloxacino, do produto da degradação fotolítica e também de sua impureza de síntese, pesquisadores realizaram ensaios *in vitro* do MTT, vermelho neutro e cometa utilizando células 3T3. A impureza de síntese e o produto de degradação foram mais citotóxicos em relação ao fármaco e no teste cometa o mesilato de gemifloxacino apresentou maior genotoxicidade (PAIM et al., 2013).

Na avaliação *in vitro* de dois produtos majoritários da fotodegradação do lodenafil utilizando células mononucleares, o teste de LDH mostrou que estes não são citotóxicos no ensaio realizado (CODEVILLA et al., 2013).

Pesquisadores avaliaram *in vitro* o cloridrato de besifloxacino e também os produtos da fotodegradação, utilizando o ensaio de LDH em células mononucleares. O teste realizado em diferentes concentrações não apresentou toxicidade em nenhuma das substâncias analisadas (COSTA et al., 2014).

Da mesma forma, foi realizada a avaliação *in vitro* do etexilato de dabigatrana e também de dois produtos resultantes da degradação térmica, utilizando células mononucleares e o teste de LDH. A partir dos resultados obtidos, não houve redução da viabilidade celular nos compostos analisados (BERNARDI et al., 2015).

3.3.1. Células 3T3

A avaliação da toxicidade aguda através de ensaios utilizando modelo animal como ratos e camundongos é muito aplicada na pesquisa de novos medicamentos. No entanto, o emprego de linhagens celulares como métodos alternativos está cada vez mais difundido no intuito de reduzir a utilização de modelos animais (HUANG et al., 2017; MANNERSTRÖM et al., 2017).

Esta linhagem celular tem origem de culturas de embrião inteiras sendo capaz de dividir-se indefinidamente e é altamente sensível a inibição após a confluência da divisão celular. Estas crescem em monocamada e não se acumulam fazendo com que a divisão celular não ocorra quando a superfície já está encontra coberta. Quando esta linhagem celular é tratada com um carcinógeno, esta desenvolve uma população de

células que não impedem a sua proliferação e ocorre o crescimento destas sobre as células normais de modo a produzir uma morfologia celular aberrante (SAKAI, 2007).

Atualmente, as diretrizes da *Organization for Economic co-Operation and Development* (OECD) apresenta um modelo padronizado para avaliação da toxicidade aguda *in vitro* utilizando células 3T3 do fibroblasto ou células NHK (queratinócitos humanos normais) onde estas são mais dispendiosas e trabalhos para usar, desta forma, as células 3T3 são as mais empregadas nos ensaios realizados (OECD, 2010).

No intuito de verificar se esta linhagem celular é capaz de predizer a toxicidade em camundongos, pesquisadores investigaram 120 resultados de citotoxicidade que empregaram células 3T3 e compararam com estudos de toxicidade aguda realizados em camundongos. A análise realizada verificou que o emprego deste modelo alternativo é capaz de prever com relativa certeza a toxicidade em camundongos permitindo a redução do uso de roedores para a realização destes testes (HUANG et al., 2017).

Com o objetivo de avaliar a capacidade carcinogênica utilizando células 3T3, MASCOLO e colaboradores testaram compostos conhecidos com atividade carcinogênica positiva. A partir dos ensaios realizados, foi possível verificar que o modelo utilizado é uma alternativa eficaz para predizer o risco carcinogênico em humanos (MASCOLO et al., 2010).

3.4. ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

De acordo com o ICH S2(R1), os testes de genotoxicidade correspondem aos testes *in vitro* e *in vivo* utilizados para avaliar compostos que induzam danos genéticos a partir de mecanismos variados. Tais testes permitem identificar riscos em relação à fixação e danos ao DNA, sendo que alterações cromossômicas estão associadas a processos tumorais e também em casos de aneuploidia nas células germinativas (ICH S2(R1), 2011).

De acordo com o ICH S2(R1), compostos que possuem resultado positivo em testes de genotoxicidade podem ser potencialmente cancerígenos e/ou mutagênicos, sendo a realização de mais de um ensaio necessário, pois um único teste não permite detectar todos os mecanismos genotóxicos (ICH S2(R1), 2011).

Segundo este guia, sugere-se realizar um teste de mutação reversa bacteriana e outro teste em células de mamífero *in vitro* e/ou *in vivo*. O teste Ames é um ensaio de mutação reversa bacteriana que permite detectar alterações genéticas relevantes e também a maioria dos carcinógenos genotóxicos em roedores e humanos (ICH S2(R1), 2011).

Dentre os testes em células de mamíferos, os ensaios validados que podem ser utilizados são: o ensaio de metáfase *in vitro* de aberração cromossômica, teste *in vitro* do micronúcleo e o teste de mutação genética das células tk do linfoma de rato (ICH S2(R1), 2011).

Os micronúcleos são gerados durante a divisão celular a partir de fragmentos dos cromossomos ou mesmo deles inteiros durante a mitose, podendo ser detectados como partículas extracelulares. Desta forma, o ensaio do micronúcleo avalia aberrações cromossômicas numéricas e estruturais presentes em uma frequência de células mononucleadas dentro de uma fração representativa destas células (FRIEAUFF et al., 1998).

O ensaio cometa ou eletroforese de célula única em gel é um dos métodos padrões para avaliar os danos no DNA, apresentando como vantagens a simplicidade do método, sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia, sendo amplamente utilizado para avaliar a segurança de novos medicamentos (COLLINS, 2004).

Este ensaio é aplicado na área de toxicologia genética para avaliar a genotoxicidade de diversos produtos químicos tanto *in vitro* quanto *in vivo* podendo-se utilizar células humanas, de animais ou de plantas (ROJAS et al, 1999).

Conforme ROJAS e col. (1999) as vantagens da técnica compreendem os seguintes aspectos:

- os dados são recolhidos em nível das células individuais e podem ser obtidos dentro de algumas horas;
- é necessário somente um pequeno número de células;
- maioria da população de células eucarióticas pode ser utilizada;
- o ensaio é sensível, simples e de baixo custo;
- é possível avaliar o dano no DNA em células não proliferativas, permitindo detectar respostas não uniformes dentro de uma população mista.

3.4.1. Impurezas genotóxicas

O controle e a qualificação de impurezas tóxicas exigem atenção especial, visto que apresentam atividade biológica indesejável no organismo e, principalmente, alguns mecanismos de genotoxicidade apresentam risco à saúde em qualquer nível de exposição (AHUJA, 2007; BERCU et al., 2009).

As impurezas genotóxicas podem induzir mutações genéticas, quebras e/ou rearranjos cromossômicos, apresentando potencial de promover alterações neoplásicas (ROBINSON, 2010; RAMAN et al., 2011).

A *European Medicines Agency* (EMA), em 2006, publicou um guia recomendando que qualquer impureza deve ser identificada caso exista genotoxicidade ou se a sua estrutura química seja um alerta para toxicidade. Também foi adotado o conceito “*threshold of toxicological concern*” no qual estabelece a dose segura para todos os potenciais carcinógenos, sendo que este limite corresponde a 15 µg/dia (ROBINSON, 2010; RAMAN et al., 2011; DOW, et al., 2013).

Caso o medicamento apresente mais de uma impureza genotóxica, o limite de 15 µg/dia é aplicado para cada impureza que não tenha estrutura química semelhante. Porém, se as impurezas encontradas apresentem estruturas semelhantes, este valor corresponde ao limite total permitido (ROBINSON, 2010).

O guia ICH M7 determina os níveis de impurezas que não são carcinogênicos e apresenta testes que avaliam o potencial mutagênico da substância ativa ou produto acabado presentes na substância ativa ou produto acabado (Tabela 3.2) com o intuito de garantir a segurança e qualidade para os usuários (ICH M7, 2014).

Tabela 3.2 Classificação das impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico com resultados de ações de controle (ICH M7, 2014).

Classe	Definição	Proposta de ação para controle
1	Carcinogenicidade e mutagênicidade conhecida	Controle dos níveis permitidos ou abaixo do limite aceitável específico do composto
2	Mutagênicos conhecidos com potencial carcinogênico desconhecido (mutagenicidade bacteriana conhecida*, ausência de dados de carcinogenicidade em roedores)	Controle dos níveis permitidos ou abaixo dos limites aceitáveis (TTC** apropriado)
3	Alerta estrutural, estrutura não relacionada com a substância farmacológica; ausência de dados sobre mutagenicidade	Controle dos níveis permitidos ou abaixo dos limites aceitáveis (TTC** apropriado) ou conduzir ensaio de mutagenicidade bacteriana Se não mutagênico = classe 5 Se mutagênico = classe 2
4	Alerta estrutural, mesmo alerta na substância farmacológica ou compostos relacionados com o fármaco (por exemplo, intermediários no processo) que foram testados e não são mutagênicos	Tratar como impureza não mutagênica
5	Ausência de alerta estrutural ou estrutura de alerta com dados suficientes que demonstram falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade	Tratar como impureza não mutagênica

* Ou outros dados relevantes de mutagenicidade positiva indicativos de reatividade no DNA relacionados com a indução de mutações genéticas (por exemplo, resultados positivos em estudos *in vivo* de mutações genéticas).

** TTC “*threshold of toxicological concern*”.

De acordo com a Tabela do ICH, impurezas encontradas com valores abaixo do limite de identificação também devem ter sua estrutura química conhecida para avaliação de um possível alerta estrutural (ROBINSON, 2010).

O ICH S2(R1) fornece informações referentes aos testes validados que podem ser utilizados para a avaliação da genotoxicidade e orienta com relação à interpretação dos resultados positivos encontrados tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ICH S2(R1), 2011).

De acordo com *Pharmaceutical Research and Manufacturing Association* (PhRMA), documentos com propostas relacionadas ao tema foram debatidas em reuniões públicas e abordam procedimentos para teste, classificação, qualificação e risco toxicológico de potenciais impurezas genotóxicas em produtos farmacêuticos. Nessa proposta, todas as impurezas identificadas ou preditas devem ser classificadas entre cinco categorias (MC-GOVERN e JACOBSON-KRAM, 2006):

- Impureza genotóxica e carcinogênica;
- Impureza genotóxica, mas com potencial carcinogênico desconhecido;
- Impureza com uma única estrutura química alerta e potencial genotóxico desconhecido;
- Impureza com estrutura relacionada alerta para ingrediente farmacêutico ativo;
- Impureza sem alerta estrutural.

A *United State Environmental Agency* (US EPA) publicou um guia relacionado à susceptibilidade de câncer na população pediátrica, indicando que crianças expostas a agentes cancerígenos entre as idades de zero a dezesseis anos têm risco aumentado ao longo da vida de 70 anos, em comparação com adultos. O risco aumenta 10 vezes em exposição antes dos dois anos e três vezes entre 2 a 16 anos (MC-GOVERN e JACOBSON-KRAM, 2006).

Softwares computacionais são utilizados como ferramentas para determinação preliminar de impurezas com potencial genotóxico ou citotóxico a partir de informações relacionadas às características estruturais da molécula, sendo que o sistema de modelagem identifica os grupamentos químicos que são potencialmente tóxicos. Estas ferramentas são úteis em conjunto com equipamentos analíticos para desenvolvimento de metodologia adequada para identificação e caracterização das impurezas (MC-GOVERN e JACOBSON-KRAM, 2006).

As pesquisas relacionadas às impurezas genotóxicas de fármacos têm recebido maior atenção nos últimos anos. REDDY e col. (2013) desenvolveram metodologia analítica para quantificar potenciais impurezas genotóxicas no fármaco zolmitriptano utilizando CLUE-MS/MS, sendo que o método mostrou ser linear, específico, exato e preciso.

LIU e col. (2009) desenvolveram e validaram metodologia por CLAE com detecção DAD para análise de cinco impurezas genotóxicas do cloridrato de pazopanib. Além da metodologia analítica, os autores sugerem estratégias para o controle destas impurezas durante o processo de desenvolvimento do fármaco.

Foi desenvolvida e validada metodologia analítica por CLAE para determinação do montelucaste e seis impurezas. Na análise dos medicamentos comercializados, uma das impurezas estava presente em concentrações acima do permitido, desta forma, foi realizado o teste Ames e a partir dos resultados obtidos verificou-se que esta não era genotóxica (EMERCE et al., 2015).

Pesquisadores desenvolveram e validaram metodologia para determinação de três impurezas genotóxicas do fendizoato de cloperastina. Uma das impurezas foi analisada por GC-MS e outras duas por CLAE com detecção DAD (GARCÍA et al., 2012).

3.5 DIABETES MELLITUS

O *diabetes mellitus* tipo 2 é uma doença que se caracteriza por altos níveis de glicose como resultado da resistência à insulina ou mesmo da diminuição da secreção de insulina (HENNESS e KEAM, 2006; BLAIR, 2016).

A captação de glicose pelas células é regulada pelo hormônio insulina, sendo que este é produzido pelas células beta nas ilhotas de Langerhans localizadas no pâncreas. A secreção de insulina ocorre em função do aumento nos níveis de glicose no sistema sanguíneo e a diminuição nos níveis de glicose inibem a liberação da insulina (NAIR, 2007).

Esta patologia, na maioria das vezes, desenvolve-se em indivíduos com fatores de risco e predisposição genética, sendo que a obesidade e, principalmente, a obesidade abdominal representam importantes fatores de risco. Outros predisponentes consistem em baixos níveis de colesterol HDL e estilo de vida sedentário (BLAIR, 2016).

Esta é uma das doenças metabólicas mais comuns no mundo, sendo que a prevalência em adultos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas. Fatores como urbanização e mudanças no estilo de vida, aliados aos fatores de risco, vem aumentando o número de casos de doenças crônicas degenerativas, como o diabetes tipo 2 (GUARIGUATA et al., 2014), sendo que no Brasil, 72,4% das causas de morte pertencem a este grupo de doenças (BRASIL, 2014).

Dados mostram que, em 2013, aproximadamente 382 milhões de pessoas tinham diabetes, e estimativas mostram que até 2035 este número irá aumentar para 592 milhões (GUARIGUATA et al., 2014). No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que houve um aumento significativo na prevalência de diabetes na população de 2006 a 2013, sendo a população feminina mais afetada (BRASIL, 2014).

O diagnóstico inclui a medição da glicemia em jejum, teste oral de tolerância à glicose com medição após duas horas combinado com hemoglobina glicosilada (A1C), que mede a quantidade de hemoglobina glicosilada em relação à hemoglobina total, durante um período de dois a três meses (BLAIR, 2016).

Um controle rigoroso da glicemia permite reduzir a morbidade e mortalidade relacionadas a essa patologia, porém a perda da eficácia de alguns medicamentos associada à baixa tolerabilidade e falta de adesão em função dos efeitos adversos desafiam as pesquisas em busca de tratamentos com melhores resultados (DUEZ et al., 2012).

Em longo prazo, esta patologia pode gerar complicações, como retinopatia, nefropatia, neuropatia e doenças relacionadas ao sistema cardiovascular. Desta forma, estudos demonstram que a redução da glicemia nesses pacientes, em resposta ao tratamento adequado, diminui o risco de complicações (DHILLON, 2010).

Complicações microvasculares comprometem pequenos vasos sanguíneos levando à insuficiência renal, cegueira, distúrbios do pé diabético e infecções. As complicações macrovasculares geram danos em vasos sanguíneos maiores causando doenças cardiovasculares, como acidente vascular cerebral, ataque cardíaco e insuficiência do fluxo sanguíneo nos membros inferiores. Observa-se que o adequado controle da pressão arterial e dos níveis de lipídios contribui na prevenção ou retardam estas condições (BLAIR, 2016).

3.6. FÁRMACOS HIPOGLICEMIANTES

Diversas são as opções de tratamento do diabetes, podendo-se administrar mais de um medicamento simultaneamente. Caso a terapia não seja efetiva com apenas um fármaco, é aconselhável adicionar outro ativo de diferente classe, ao invés de realizar uma mudança imediatamente (BLAIR, 2016).

Para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2, a metformina é o medicamento de primeira escolha, porém nem todos pacientes tratados alcançam o resultado esperado ou aderem a terapia em razão dos efeitos adversos, necessitando de outras opções para tratamento. As sulfonilureias, meglitinidas, pioglitazona ou inibidores da DPP-4 são medicamentos alternativos nesses casos (IRONS e MINZE, 2014).

Pertencendo à classe das biguanidas, estão a metformina e a fenformina, sendo que a metformina é a mais utilizada. Este fármaco, melhora a ação da insulina, aumenta a captação de glicose e estimula a gliconeogênese. Também aumenta o número e melhora a afinidade dos receptores de insulina no adipócito e no músculo. Os medicamentos pertencentes a esta classe melhoram o perfil lipídico diminuindo os níveis de triglicerídeos e colesterol LDL e aumentando os níveis de colesterol HDL. Adicionalmente, não provocam hipoglicemia, pois não estimulam a secreção de insulina (ARAÚJO et al., 2000).

Os medicamentos secretagogos de insulina compreendem as sulfonilureias (gliburida, gliclazida, glipizida e glimepirida) e meglitinidas (nateglinida e repaglinida) e atuam estimulando a liberação de insulina a partir das células β do pâncreas. Todavia, a hipoglicemia e o ganho de peso são alguns dos efeitos adversos (IRONS e MINZE, 2014).

A clorpropamida é um exemplo das sulfoniluréias de primeira geração. A glibenclamida, gliclazida e glipizida são as de segunda geração, já a glimepirida corresponde a de terceira geração. São medicamentos indicados principalmente para pacientes com IMC dentro da normalidade, onde os níveis de insulina estejam diminuídos ou normais e o controle não esteja eficaz com dieta e exercícios (ARAÚJO et al., 2000).

Nos indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2, a rápida ou precoce secreção de insulina, que é responsável pela supressão da produção hepática de glicose restringindo o hiperinsulinismo tardio e a hiperglicemia pós-prandial, promovem melhora na tolerância à glicose. Os pacientes que realizam tratamento com os

medicamentos da classe das meglitinidas têm o restauro desta secreção com diminuição da hiperglicemia pós-prandial (ARAÚJO et al., 2000).

A acarbose, o miglitol e a voglibose correspondem aos medicamentos inibidores da α -glicosidade e atuam como antagonistas enzimáticos da sucrase e amilase diminuindo a glicemia de jejum e a hiperglicemia pós-prandial (ARAÚJO et al., 2000).

Pertencentes ao grupo das tiazolidinedionas estão a rosiglitazona e pioglitazona que aumentam e sensibilizam a ação da insulina no fígado, músculos e adipócitos, aumentando também a expressão dos transportadores de glicose. Estes medicamentos diminuem os níveis glicêmicos, porém não aumentam a secreção de insulina (ARAÚJO et al., 2000).

Os medicamentos agonistas da GLP-1 aumentam o efeito das incretinas, estimulam a secreção de insulina dependente de glicose, retardam o esvaziamento gástrico e aumentam a saciedade. Adicionalmente, contribuem para a perda de peso, promovem preservação das células β exercendo função na regeneração das mesmas. A exenatida, liraglutida e lixisenatida são exemplos desta classe (IRONS e MINZE, 2014).

Os inibidores do co-transportador sódio glicose 2 aumentam a eliminação de glicose através da urina reduzindo sua reabsorção, sendo que a canagliflozina e dapagliflozina pertencem a esta classe (IRONS e MINZE, 2014).

O trato gastrintestinal possui células neuroendócrinas que liberam peptídeos após as refeições. O peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o hormônio insulino-trópico dependente de glicose (GIP) são exemplos destes peptídeos. Estes aumentam a liberação de insulina em resposta às refeições, suprimem a secreção do glucagon e melhoram a captação de glicose (DUEZ et al., 2012).

A partir disso, pesquisadores desenvolveram uma nova classe de medicamentos que agem através da inibição da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) pois, fisiologicamente, esta inibe o GLP-1 e o GIP. Os medicamentos inibidores da DPP-4 aumentam as concentrações do GLP-1 e GIP, melhoram o jejum e a hiperglicemia após as refeições. A Figura 3.1 exemplifica as ações do GLP-1 (DUEZ et al., 2012).

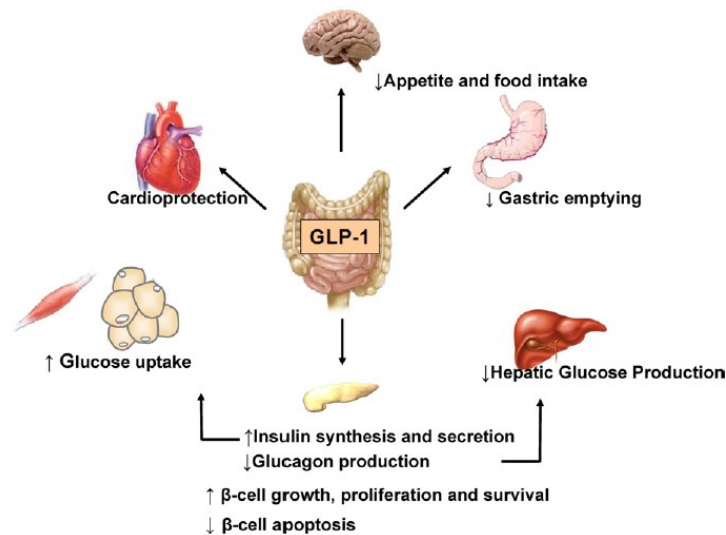


Figura 3.1 Ações fisiológicas do GLP-1 em diferentes tecidos/órgãos. Após a ingestão de uma refeição, o GLP-1 secretado pelo intestino, aumenta a secreção de insulina estimulada pela glicose (efeito incretina), diminui a produção do glucagon, glicose hepática e aumenta a proliferação e sobrevivência das células β pancreáticas. Foram descritas ações adicionais, como: esvaziamento gástrico, redução do apetite e ações cardioprotetoras. Fonte: DUEZ et al., 2012.

Os medicamentos inibidores da DPP-4 compreendem a sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, alogliptina e linagliptina (IRONS & MINZE, 2014). A Figura 3.2 ilustra a degradação do GLP-1 pela DPP-4 (DUEZ et al., 2012).

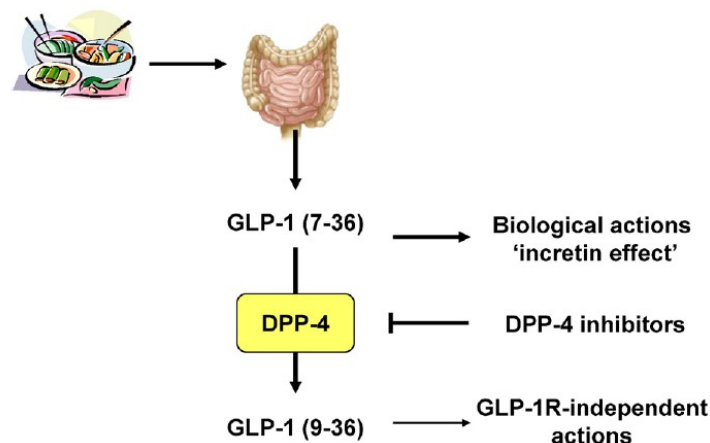


Figura 3.2 O GLP-1 tem uma meia-vida curta (1-2 minutos) devido à rápida degradação proteolítica pela DPP-4 (e eliminação renal). Os inibidores da DPP-4 aumentam a sua meia-vida resultando no prolongamento de suas ações biológicas. Fonte: DUEZ et al., 2012.

As células K enteroendócrinas presentes no duodeno sintetizam a GIP em resposta à ingesta alimentar e aumenta a secreção em insulina estimulada pela glicose. Já o hormônio GLP-1 deriva do precursor pró-glucagon e é secretado pelas células L. Ambos hormônios estimulam a secreção de insulina pelas células β e regulam a neogênese das ilhotas pancreática (DUEZ et al., 2012).

3.6.1. Sitagliptina

A nomenclatura química para a sitagliptina é 7 – [(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorofenil)butil] 5,6,7,8 tetraidro - 3 – (trifluorometil) – 1,2,4 – triazol [4,3a] pirazina fosfato (1:1). Sua fórmula molecular é $C_{16}H_{15}F_6N_5O \cdot H_2O \cdot H_3PO_4$ e possui massa molar de 532,32 g/mol. Sua estrutura química está representada na Figura 3.3 (FDA, 2014).

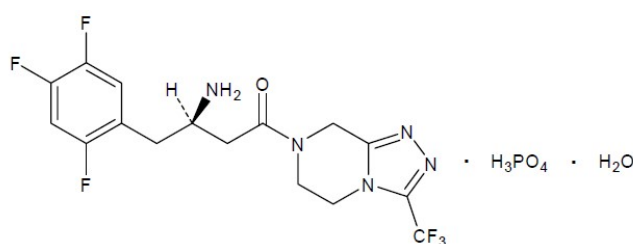


Figura 3.3. Estrutura química do fosfato de sitagliptina.

Este fármaco possui grupamentos amino e triazol, que são responsáveis pelo seu caráter básico. Adicionalmente, possui um centro quiral, porém este é comercializado na sua forma enantiomericamente pura (SURESH et al., 2016).

A sitagliptina encontra-se na forma de um pó cristalino e não é higroscópico. Possui solubilidade em água e N,N-dimetilformamida, sendo ligeiramente solúvel em metanol, etanol, acetona e acetonitrila. É insolúvel em isopropanol e acetato de isopropila (SHANTIKUMAR et al., 2014).

Através da análise térmica por DSC da sitagliptina, pesquisadores observaram que a decomposição térmica inicia em 217°C e em 212,1°C ocorre a fusão deste composto. Porém, a ocorrência deste fato deve-se também a uma possível decomposição, pois não é verificado o retorno para a linha base normal (SHANTIKUMAR et al., 2014).

Nesta mesma pesquisa, foram realizados testes por DSC no intuito de avaliar a interação de cada um dos excipientes com o fármaco, realizando três técnicas distintas para a preparação da amostra e observando o efeito da manipulação mecânica frente à estabilidade físico-química do fármaco (SHANTIKUMAR et al., 2014).

A partir dos resultados obtidos, a compatibilidade da sitagliptina com seus excipientes indicou que os ácidos cítrico e ascórbico influenciam gerando modificações nos perfis térmicos. A técnica por Difração em Raios X auxiliou nos estudos corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa (SHANTIKUMAR et al., 2014).

A sitagliptina após a administração oral de 100 mg é rapidamente absorvida com uma biodisponibilidade oral absoluta de 87%. Atinge concentração plasmática máxima entre 1 e 4 horas após a administração, sendo eliminada na urina (87%) e nas fezes (13%). Idade, gênero, índice de massa corporal ou raça não alteram significativamente a farmacocinética deste medicamento (DHILLON, 2010; SCHEEN, 2010).

Este fármaco aumenta os níveis dos hormônios incretinas por inibir a degradação das formas ativas do GLP-1 e GIP. O tratamento aumenta a insulina pós-prandial, os níveis do peptídeo C com redução nos níveis de glucagon e redução da glicose. A administração da sitagliptina e metformina apresentam efeitos aditivos sobre GLP-1 sugerindo que a metformina aumenta a atividade e os níveis do GLP-1 (DHILLON, 2010).

A terapia combinada com metformina ou pioglitazona melhora os níveis glicêmicos em pacientes com controle inadequado desta patologia. Já nos tratamentos com adição da sitagliptina ao tratamento prévio com metformina, pioglitazona, glimepirida, rosiglitazona com metformina, glimepirida com metformina ou insulina com ou sem metformina melhoraram o controle glicêmico nos pacientes com a terapia utilizada (DHILLON, 2010; DUEZ et al., 2012).

Em relação aos efeitos adversos, dores de cabeça e aumento das infecções no trato respiratório estão entre os mais frequentes (DHILLON, 2010).

Para este fármaco, foi descrita uma molécula como produto da degradação alcalina que também faz parte da sua rota sintética: 3 – (trifluorometil) – 5,6,7,8 – tetraidro [1,2,4] triazol [4,3a] pirazina (EL-BAGARY et al., 2011b). Sua estrutura

química está representada na Figura 3.4 sendo que corresponde à impureza 1, alvo de estudo nesta pesquisa.

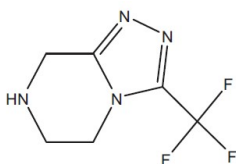


Figura 3.4. Estrutura química do produto de degradação da sitagliptina.

Com o objetivo de compreender a estabilidade do fármaco, pesquisadores avaliaram condições de degradação forçada monitoradas por CLAE. De acordo com os testes realizados, tanto nas condições básicas como oxidativas, foi observada a formação de um produto de degradação. Através da hidrólise ácida durante um período de 4 horas não se observou a formação de produtos de degradação (LANGE et al., 2012a).

Amostras submetidas à luz UV-C, tiveram formação mais intensa do produto de degradação. A partir da análise por espectrometria de massas, constatou-se que os prováveis produtos formados correspondem à mesma degradação molecular resultante de diferentes condições de estresse (LANGE et al., 2012a).

Testes realizados com o fármaco utilizando concentrações maiores de ácido e expondo a amostra ao calor obtiveram dois produtos de degradação majoritários. No intuito de separar e coletar os compostos formados utilizou-se equipamento CLUE-UV/MS onde um dos produtos corresponde ao mesmo composto obtido em meio básico previamente descrito por El-Bagary e col. (2011). O outro produto foi isolado e identificado como ((3R)-3-amino-4-ácido (2,4,5-trifluorofenil) butanoico) (LANGE et al., 2013).

O produto de degradação formado pela exposição à luz UV-C foi também avaliado mediante o estudo de citotoxicidade utilizando células mononucleares através do ensaio de LDH. O teste mostrou que as amostras apresentaram citotoxicidade aumentada com redução da viabilidade celular na concentração inicial do fármaco de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (LANGE et al., 2012a).

PERAMAN e col. (2013) avaliaram simultaneamente a estabilidade da metformina e sitagliptina em formas farmacêuticas através da técnica por CLAE utilizando a coluna C8 com análise em 267nm. Este método resultou na detecção de

quinze produtos de degradação sendo que quatro destas estruturas foram identificadas.

Adicionalmente, outro grupo de pesquisa desenvolveu uma metodologia rápida e simples para determinação simultânea de sitagliptina e metformina em preparações farmacêuticas por eletroforese capilar de zona com detecção UV em 203 nm. Este método também determinou a presença destes fármacos em plasma humano (SALIM, et al., 2012).

Comprimidos de sitagliptina também foram analisados através da técnica de cromatografia eletrocínética micelar, sendo que o desenvolvimento e a validação do método apresentaram alta eficiência e resolução com as vantagens do rápido tempo de análise aliado ao baixo consumo de amostra e reagentes (LANGE et al., 2012b).

Por apresentar um centro quiral, pesquisadores desenvolveram e validaram uma metodologia reprodutível e robusta para separação enantiosseletiva da sitagliptina e do seu enantiômero (S) utilizando CLAE (RAMESH et al., 2014).

Da mesma forma, para a avaliação da impureza enantiomérica (S) da sitagliptina MONE e col. (2014) desenvolveram e validaram uma metodologia capaz de separar e quantificar por CLAE utilizando fase estacionária quiral.

Com o objetivo de desenvolver um método indicativo de estabilidade para análise simultânea da sitagliptina e sinvastatina em comprimidos, foi utilizada a técnica por CLAE com detecção em 253 nm e coluna C8 sendo que este se mostrou sensível, reprodutível e específico para o objetivo proposto (RAMALINGAM et al., 2014).

Outro estudo também desenvolveu um método indicativo de estabilidade utilizando cromatografia líquida de fase reversa para determinação simultânea da sitagliptina em presença dos produtos de degradação ácida e alcalina juntamente com a sinvastatina e o correspondente produto de degradação hidrolítica. O método desenvolvido permitiu a avaliação das respectivas substâncias tanto no fármaco quanto no produto acabado (EL-BAGARY et al., 2014).

Uma metodologia analítica foi desenvolvida e validada para quantificar sitagliptina e sinvastatina em plasma humano utilizando a técnica de LC-MS/MS e carbamazepina como padrão interno. O tempo de análise foi de 3 minutos permitindo analisar mais de 300 amostras por dia e também foi realizado estudo farmacocinético em voluntários (BURUGULA et al., 2013).

Pesquisadores desenvolveram e validaram metodologia para quantificação simultânea da metformina e sitagliptina em plasma humano por LC-MS/MS em tandem

utilizando coluna C18 com tempo de análise de dois minutos (BONDE et al., 2013). Da mesma forma, outro grupo de pesquisa estudou os mesmos fármacos para aplicar em estudos de bioequivalência através da técnica por LC-MS/MS (REDDY et al., 2015).

Com o mesmo objetivo, utilizando cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas determinou-se simultaneamente metformina e sitagliptina em plasma humano onde os analitos foram obtidos por extração em fase sólida por pareamento iônico. De maneira complementar, realizou-se estudo farmacocinético com 16 voluntários saudáveis (SHAH et al., 2016).

Utilizando extração em fase sólida e posterior análise por LC-MS/MS, pesquisadores desenvolveram metodologia analítica para quantificação da sitagliptina em plasma humano permitindo avaliação farmacocinética do medicamento (NIROGI et al., 2008).

SCHERF-CLAVEL e HÖGGER, 2015 desenvolveram e validaram metodologia para determinação de metformina, sitagliptina e creatinina em mancha de sangue seco em papel (*dried blood spots* - DBS) com posterior aplicação da técnica em amostras de sangue capilar dos pacientes diabéticos. Adicionalmente, foi possível avaliar a distribuição *in vitro* da sitagliptina e metformina entre o plasma e as células sanguíneas colaborando para avaliações farmacocinéticas.

3.6.2. Vildagliptina

A nomenclatura química para a vildagliptina é (2S) -1- [N- (3-hidroxi-1-adamantil) glicil] pirrolidina -2- carbonitrila. Sua fórmula molecular é $C_{17}H_{25}N_3O_2$ e possui massa molar de 303,40 g/mol. Sua estrutura química está representada na Figura 3.5.

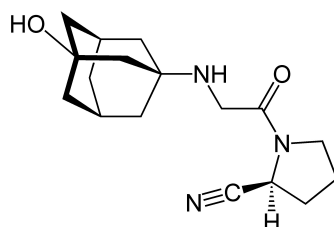


Figura 3.5. Estrutura química da vildagliptina.

A vildagliptina apresenta uma biodisponibilidade oral absoluta de 85%, atinge concentração plasmática máxima de 1 a 2 horas após a administração sendo eliminada nas fezes (15%) e na urina (85%) (HENNESS e KEAM, 2006; SCHEEN, 2010). Apresenta baixa ligação às proteínas plasmáticas (9,3%) e é igualmente distribuída tanto no plasma quanto nos eritrócitos (KEATING, 2010).

A excreção urinária é a principal forma de eliminação, sendo que 23% da dose oral ingerida é eliminada de maneira inalterada e a meia vida de eliminação ocorre de 2 a 3 horas após a administração oral. O principal metabólito resulta da hidrólise do grupo ciano e este é farmacologicamente inativo. A hidrólise da ligação amida, glicuronidação e oxidação formam os metabólitos adicionais (LAUSTER, et al., 2007; KEATING, 2010).

A vildagliptina não é nem metabolizada e nem inibida pelo citocromo P450, sendo assim, indutores ou inibidores não sofrem alteração se administrados em combinação (LAUSTER, et al., 2007; KEATING, 2010; SCHEEN, 2010).

A incidência de efeitos adversos no trato gastrointestinal é baixa, não existindo evidências sobre aumento de náuseas ou diarreia em comparação com o placebo. Da mesma forma não são relatados episódios de hipoglicemia e ganho de peso. A tolerância deste medicamento em pacientes com insuficiência renal leve é semelhante aos pacientes que apresentam função renal normal (KEATING, 2010).

Este fármaco pode ser administrado em combinação com a metformina, sulfonilureias ou tiazolidinedionas (KEATING, 2010).

Testes de degradação forçada por CLAE apresentaram para condição básica a formação de um produto de degradação. Nas condições oxidativa e térmica foram detectados dois picos adicionais relacionados aos produtos de degradação (BARDEN et al., 2012).

O principal produto de degradação (Figura 3.6) presente nas três condições testadas teve sua estrutura identificada e elucidada utilizando as técnicas por LC-MS/MS e ressonância magnética nuclear (BARDEN et al., 2012).

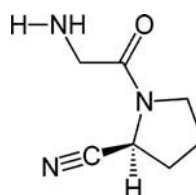


Figura 3.6. Estrutura química do produto de degradação majoritário.

Estudos complementares avaliando a citotoxicidade deste mesmo produto de degradação, utilizando células mononucleares pelo ensaio de LDH, revelaram que o composto estudado não apresentou danos à membrana celular, demonstrando não haver toxicidade nas condições testadas (BARDEN, 2014).

A literatura descreve a determinação de estudos de estabilidade da vildagliptina através do método por eletroforese capilar de zona utilizando cloridrato de ranitidina como padrão interno e com detecção UV em 207 nm. Esta metodologia desenvolvida foi comparada com a técnica por CLUE, onde a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os métodos (BARDEN et al., 2014). Outro estudo desenvolveu uma metodologia rápida e confiável por eletroforese capilar de zona para a determinação simultânea de vildagliptina e metformina em comprimidos (BARDEN et al., 2013).

O desenvolvimento de uma metodologia simples e precisa utilizando cromatografia líquida de fase reversa para determinação de vildagliptina em comprimidos analisou e também determinou a estrutura molecular do principal produto de degradação obtido, mostrando que esta metodologia validada não sofre interferência dos excipientes ou do produto de degradação (BARDEN et al., 2012).

Pesquisadores desenvolveram e validaram metodologia analítica por cromatografia líquida em fase reversa para avaliação simultânea da vildagliptina e seu intermediário de síntese, 3-amino-1-adamantanol. Foi utilizada coluna C18 e detecção UV em 220 nm (EL-BAGARY et al., 2011a).

A partir da síntese da vildagliptina, seguindo metodologia previamente descrita e realizando pequenas alterações, um grupo de pesquisadores identificaram uma impureza de síntese e seu respectivo produto de degradação. Este trabalho abordou seus mecanismos de fragmentação e também a elucidação destas estruturas (KUMAR et al., 2016).

Pesquisadores desenvolveram e validaram metodologia por eletroforese capilar de separação quiral da impureza enantiomérica da vildagliptina. Neste estudo, foi utilizado ciclodextrina como seletor quiral (KAZSOKI et al., 2016).

Foi desenvolvida e validada metodologia por CLUE-MS/MS para determinação simultânea da sitagliptina, vildagliptina e metformina na presença dos respectivos produtos de degradação e de duas impurezas da sitagliptina. Os fármacos foram submetidos à degradação forçada e se mostraram suscetíveis em condições alcalinas (MOWAKA & MOHAMED, 2015).

PHARNE e col., 2012 desenvolveram uma metodologia simples, rápida, seletiva e precisa por CLAE de fase reversa para determinação em plasma com detecção em 210 nm, sendo aplicável para estudos farmacocinéticos da vildagliptina.

Em outro estudo, pesquisadores desenvolveram e validaram metodologia analítica por CLAE-MS/MS para determinação simultânea da metformina e vildagliptina em plasma humano utilizando voluntários saudáveis (PONTAROLO et al., 2014).

Com o intuito de determinar simultaneamente metformina, vildagliptina e 3-amino-1-adamantanol (material de partida na síntese da vildagliptina) em plasma, utilizando UPLC-MS/MS, uma metodologia analítica empregando coluna C-18 e 0,5% de ácido acético em metanol e 0,02M de acetato de amônia em solução aquosa (10:90v/v) como fase móvel mostrou-se rápida e simples para estudos de farmacocinética (EL BAGARY et. al., 2016).

3.6.2.1 3-amino-1-adamantanol

O 3-amino-1-adamantanol é um dos materiais de partida utilizados na síntese da vildagliptina e corresponde à impureza 4 do presente trabalho.

Com o objetivo de conseguir maior pureza na recristalização deste material de partida, LI e col. (2016) avaliaram a estabilidade em diferentes solventes.

A partir dos resultados obtidos, os autores verificaram que sua solubilidade em metanol, n-propanol, n-butanol e tetraidrofurano é relativamente pequena. Já em etanol e na mistura binária de etanol e água, a solubilidade é maior, aumentando com a elevação da temperatura e tornando possível a cristalização desta substância. Porém, com o aumento da proporção de água, em temperatura constante, a solubilidade diminui. A partir dos resultados obtidos, foi sugerido o uso da água como anti solvente no processo de cristalização para colaborar na purificação durante a síntese da vildagliptina (LI et al., 2016).

O 3-amino-1-adamantanol pertence à classe dos adamantanos, que são compostos rígidos e simétricos, sendo que seus derivados podem ser utilizados como intermediários químicos em produtos naturais e farmacêuticos (LI et al., 2016). A estrutura química do adamantano é composta por três ciclohexanos fundidos uns aos outros na conformação cadeira. Apresenta como características físico-químicas

estabilidade térmica e oxidativa, alta lipofilicidade e baixa energia relacionada a sua estabilidade estrutural (SPILOVSKA et al., 2016).

Diversos derivados do adamantano foram sintetizados e apresentaram resultados positivos em testes biológicos sendo utilizados na prática farmacêutica, atuando como antivirais, antimicrobianos, antidiabéticos, anti-inflamatórios e compostos com ação no sistema nervoso central (SPILOVSKA et al., 2016).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

A análise dos medicamentos contribui para a eficácia e segurança máxima da terapia medicamentosa, bem como na economia da produção destes produtos. Na investigação analítica é avaliada a matéria-prima, os intermediários de síntese, produtos de degradação e também as amostras biológicas contendo os medicamentos e seus metabólitos (GÖRÖG, 2007).

Desta forma, são necessárias ferramentas analíticas capazes de detectar, identificar e quantificar amostras nas mais variadas condições, onde o aperfeiçoamento de novas tecnologias possui um importante papel no intuito de garantir o maior sucesso na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos na análise farmacêutica (LEE e KERNS, 1999; HOLM e ELDER, 2016).

Métodos rápidos, sensíveis e seletivos mostram-se cada vez mais necessários para suprir a demanda nas análises farmacêuticas. Aliado a isso, procuram-se metodologias que possibilitem avaliar misturas complexas utilizando instrumentação compatível com a necessidade requerida (LEE e KERNS, 1999; HOLM e ELDER, 2016).

3.7.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) corresponde a uma técnica de separação de compostos, permitindo separar e distinguir misturas complexas em componentes separados. A partir do cromatograma obtido, observa-se que cada pico obtido corresponde a um componente, sendo característico de cada formulação (LEE e KERNS, 1999).

Esta técnica é amplamente utilizada durante o desenvolvimento de fármacos e aceita universalmente pela indústria farmacêutica visto que permite analisar diversos

compostos e possibilita a utilização de várias opções de metodologias. (LEE e KERNS, 1999).

A CLAE é uma ferramenta analítica de separação que apresenta alta resolução, resposta reprodutível, fácil automação de operação do instrumento e análise de dados com capacidade de adaptação em procedimentos de grande porte. A utilização do equipamento suporta tamanhos de partículas muito pequenas (3-5 μ m) e grandes áreas de superfície, permitindo a aplicação de pressões elevadas para o escoamento do solvente (GUMUSTAS et al., 2013).

O mecanismo de separação desta técnica depende da interação entre a fase estacionária, o analito e a fase móvel (ZOTOU, 2012). Nesta técnica, o solvente que compreende a fase móvel é impulsionado por uma bomba de alta pressão em direção à coluna, onde a amostra é introduzida na fase móvel no qual ambos passam para a coluna e ocorre a separação. Após isso, são direcionados para o detector, onde um *software* capta o sinal gerado em função do tempo de análise (LANÇAS, 2009).

Por utilizar tamanho de partícula pequeno na fase estacionária, a resolução e velocidade de separação tornam-se mais eficientes, sendo que é uma técnica bastante utilizada para determinação de fármacos na matéria-prima e no produto acabado (OLSEN et al., 2006).

Pesquisadores desenvolveram metodologia analítica utilizando a técnica por CLAE para analisar atorvastatina e suas correspondentes impurezas, apresentando resolução adequada de acordo com os parâmetros de validação (ERTÜRK et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar alogliptina e suas impurezas, um grupo de pesquisa utilizou a técnica por CLAE para determinação e quantificação destes compostos após a síntese e identificação de sete compostos relacionados ao fármaco (ZHANG et al., 2015).

O fármaco ticagrelor e duas impurezas de síntese foram avaliados por CLAE. A metodologia desenvolvida foi validada, sendo que dois produtos majoritários de degradação por radiação UVC foram elucidados (BUENO et al., 2017).

Um grupo de pesquisa desenvolveu e validou metodologia analítica por CLAE para determinação das impurezas timina e timidina no fármaco estavudina. A timina é o principal produto de degradação hidrolítica, oxidativa e térmica, já a timidina corresponde à impureza de síntese do fármaco estudado (SILVA et al., 2008).

Sabe-se que a CLAE é uma técnica amplamente utilizada nas análises rotineiras em laboratórios, mas, com o tempo, tornou-se necessário a busca por análises mais rápidas que continuem garantindo o bom desempenho cromatográfico (MALDANER e JARDIM, 2009).

Para tanto, uma das alternativas foi à utilização de colunas menores juntamente com aumento da vazão na fase móvel, porém observou-se menor desempenho cromatográfico e perda na resolução (MALDANER e JARDIM, 2009).

A utilização de colunas monolíticas, que são caracterizadas por um meio contínuo de separação, altamente poroso e preparadas de material polimérico ou sílica. Essas colunas apresentam eficiências similares às que possuem partículas de 3- 3,5 μm , mas com maior permeabilidade em comparação com os materiais particulados, onde o uso de vazões maiores não aumenta a pressão no sistema e nem perde a eficiência. Porém, são pouco utilizadas com o espectrômetro de massas, consomem grandes quantidades de solventes e apresentam estabilidade limitada a uma pequena faixa de pH (2,0 – 8,0) (MALDANER e JARDIM, 2009).

A utilização de partículas menores que 2 μm diminui o tempo de análise, entretanto, a pressão tem sido limitante no desempenho cromatográfico. Dessa forma, foram desenvolvidos sistemas capazes de suportar altas pressões utilizando partículas com tamanhos menores, sendo denominado de cromatografia líquida de ultra eficiência (MALDANER e JARDIM, 2009).

3.7.2. Cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE)

Na CLUE, o mecanismo de separação é o mesmo da CLAE, porém a velocidade de separação, sensibilidade e resolução são melhores. Nesta técnica, a redução no tempo de análise é considerável e, conseqüentemente, a redução no consumo de solvente (NOVÁKOVÁ, et al., 2006).

Contudo, é necessário investir mais tempo durante o período de desenvolvimento do método, para ambientar ou reambientar a coluna em casos de eluição por gradiente ou quando o tempo de análise do método desenvolvido for muito curto (NOVÁKOVÁ, et al., 2006).

A utilização dessa técnica necessitou do desenvolvimento de um novo sistema instrumental na cromatografia, capaz de aumentar o desempenho na separação com

diminuição do volume morto e também para suportar pressões elevadas. Neste sistema, são utilizadas colunas pequenas, onde a eficiência é proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional ao tamanho de partícula (ZOTOU, 2012).

Para suportar as altas pressões, devem ser usadas novas partículas porosas, que mantenham a retenção e a capacidade semelhantes à CLAE. Partículas a base de sílica apresentam resistência mecânica, mas possuem uma faixa limitada de trabalho e compostos básicos apresentam cauda. As colunas poliméricas aceitam uma faixa limitada de pH, porém são pouco eficientes. Na sequência, foram desenvolvidas novas partículas com incorporação de carbono na forma de grupamentos metila apresentando alta eficiência e podendo operar em uma ampla faixa de pH. Também foram desenvolvidas partículas, onde os grupos metilas ficam diretamente ligados na matriz da sílica (ZOTOU, 2012).

A CLUE utiliza fases estacionárias com partículas menores que 2 μm , sendo que a utilização destas aliada às altas velocidades lineares da fase móvel aumentam a detectabilidade e a resolução, diminuindo também o tempo das análises. Esta técnica apresenta vantagens em relação à CLAE por ser muito mais rápida, consumir menos solventes e apresentar eficiência mais elevada, onde a detectabilidade é de 2-3 vezes maior (MALDANER e JARDIM, 2009). Estas características são adequadas para analisar preparações farmacêuticas complexas (NOVÁKOVÁ, et al., 2006).

A instrumentação utilizada para a CLUE é resistente a altas pressões que chegam também a valores acima de 103,55 MPa, enquanto que na CLAE as pressões estão em torno de 35-40 MPa (NOVÁKOVÁ, et al., 2006).

Neste sistema, o volume de injeção da amostra deve ser pequeno a fim de evitar o espalhamento da amostra resultando no alargamento do pico cromatográfico. Desta forma, a faixa de volume de injeção é de 0,1- 50 μL (MALDANER e JARDIM, 2009).

A bomba utilizada nesses sistemas deve ser capaz de impulsionar o solvente de forma suave e reprodutível em razão das altas pressões, tanto no modo isocrático como no gradiente, compensando a compressibilidade do solvente (ZOTOU, 2012).

A fim de garantir reprodutibilidade na análise, o detector deve capturar a taxa de amostragem e ter uma dispersão mínima, mantendo a eficiência na separação. São utilizados detectores UV/visível, porém o detector por espectrometria de massas é melhor nesta técnica, devido ao aumento na concentração do pico e menor dispersão

cromatográfica e vazão menor, promovendo aumento na eficiência da fonte de ionização e, portanto, melhora na sensibilidade (ZOTOU, 2012).

Diversas pesquisas para análise de impurezas estão utilizando esta técnica analítica. KONDRA e col. (2013) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica para determinação do ingrediente ativo cloridrato de nilotinibe juntamente com quatro impurezas.

Outro grupo de pesquisa determinou simultaneamente seis impurezas de síntese juntamente com o respectivo composto ativo, darunavir. A validação desta metodologia seguiu os guias internacionais, sendo adequada para quantificação dos compostos e garantia no controle de qualidade (REDDY et al., 2016).

Uma metodologia indicativa de estabilidade foi desenvolvida e validada para avaliar o naproxeno incluindo dois produtos de degradação, uma impureza relacionada e um metabólito. Este trabalho foi o primeiro que utilizou CLUE para a avaliação deste fármaco (VENKATARAO et al., 2012).

Um método indicativo de estabilidade por CLUE foi desenvolvido e validado para avaliar o tartarato de zolpidem juntamente com oito impurezas. Os produtos de degradação majoritários provenientes da degradação forçada foram identificados e a validação foi realizada de acordo com os guias do ICH (MURTHY et al., 2013).

Pesquisadores desenvolveram e validaram uma metodologia indicativa de estabilidade para avaliar por CLUE impurezas do tramadol na solução injetável após sua reconstituição. De acordo com os autores, o método mostrou-se adequado para a determinação de impurezas em amostras de plasma e também na forma farmacêutica (BINNOR et al., 2013).

No intuito de determinar impurezas da azatioprina, uma metodologia por CLUE foi desenvolvida e validada. O tempo total da análise das quatro impurezas na presença do fármaco foi de cinco minutos e os resultados obtidos para a validação mostraram-se adequados de acordo com os parâmetros estabelecidos pelos guias internacionais (DAVADRA et al., 2011).

Utilizando o CLUE, pesquisadores realizaram o primeiro relato referente à validação de metodologia para determinação de seis impurezas do metotrexato. Neste estudo, foi detectada uma nova impureza que não está descrita nem na Farmacopeia Britânica nem na Farmacopeia Europeia, sendo que esta estava em maior proporção em comparação às outras impurezas presentes (WU et al., 2014).

Uma metodologia indicativa de estabilidade utilizando CLUE para determinação de impurezas do hemitartrato de rivastigmina foi desenvolvida e validada. Com um tempo total de análise de dez minutos, onze impurezas foram detectadas simultaneamente com o fármaco (RAJU et al., 2012).

3.7.3. Espectrometria de Massas (MS)

O espectrômetro de massa trabalha com partículas carregadas a partir do íon principal e fragmentos iônicos da molécula analisada, classificando os íons de acordo com a razão massa/carga (WILLARD et al., 1974).

O equipamento é composto por uma unidade de entrada da amostra, que a leva até a fonte de íons no qual as moléculas transformam-se em íons em fase gasosa que são acelerados pelo campo eletromagnético, onde o analisador de massa separa estes íons de acordo com a razão massa/carga, sendo contados pelo detector com posterior registro e processamento pelo sistema de dados fornecendo o espectro de massas (PAVIA et al., 2010).

Quando este equipamento é acoplado com técnicas cromatográficas, a amostra é introduzida no espectrômetro de massas por meio de cromatógrafos, onde os picos cromatográficos obtidos através da separação são introduzidos individualmente na fonte de ionização do equipamento para gerar os íons (LANÇAS, 2009).

As formas de ionização utilizadas quando esta técnica encontra-se acoplada a cromatografia líquida corresponde à ionização por eletrospray, ionização química à pressão atmosférica e ionização por fótons à pressão atmosférica (LANÇAS, 2009).

O processo de ionização por *eletrospray* possibilita a obtenção de íons na pressão atmosférica, onde um solvente dissolve a amostra pressurizando em um tubo capilar sob a aplicação de voltagem. Assim sendo, na forma de um aerossol, o líquido emerge do capilar à pressão atmosférica no qual as gotículas vão perdendo o solvente e os íons fluem para o espectrômetro por indução da atração eletrostática e pelo vácuo (EL-ANEED et al., 2009; LANÇAS, 2009).

O *eletrospray* opera tanto no modo positivo quanto no negativo, sendo que, no modo positivo, o eletrodo receberá os elétrons e as gotículas que saem do spray terão carga positiva. Após a ionização, a amostra passa ao analisador de massas que separa os íons a partir da relação entre suas massas e cargas (razão m/z) (LANÇAS, 2009).

O analisador de massas do tipo Quadrupolo compreende em quatro barras dispersas em dois pares. Os íons percorrem o quadrupolo no centro a partir de uma das extremidades passando pelo eixo, sendo que apenas os que possuem uma trajetória estável chegam ao detector e os íons com oscilações erráticas colidem em uma das barras ou saem do quadrupolo (SILVERSTEIN et al., 2013).

No analisador de massas do tipo Tempo de Voo, os íons formados a partir da fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade no campo elétrico em direção a um longo tubo que direciona ao detector, onde este analisador mede o “tempo de voo” do íon dentro do equipamento (LANÇAS, 2009).

O uso do MS/MS permite analisar as fragmentações, a partir dos íons do fármaco original, sendo que íons específicos do produto e perdas neutras são adquiridos através das subestruturas das moléculas. Desta forma, estas fragmentações obtidas permitem auxiliar na identificação de novos compostos, pois a comparação do peso molecular do produto aliado às fragmentações mostram diferenças nas subestruturas conduzindo na interpretação da estrutura proposta (LEE e KERNS, 1999).

Por meio desta técnica, é possível a identificação de impurezas e outras substâncias principalmente em compostos que possuem muitos analitos de interesse (LEE e KERNS, 1999). Pesquisadores desenvolveram metodologia por CLUE-MS/MS para determinação de quatro impurezas com potencial genotóxico do fármaco zolmitriptano. O método mostrou-se sensível permitindo detectar quantidades em ppm (partes por milhão) das substâncias analisadas (REDDY et al., 2013).

Um método indicativo de estabilidade por CLUE-MS/MS foi desenvolvido e validado para determinação de três impurezas do ritonavir com um tempo de análise de onze minutos. O método foi validado de acordo com os guias oficiais mostrando-se altamente sensível, pois os limites de detecção e quantificação foram na ordem de ppm (VENUGOPAL et al., 2014).

No intuito de desenvolver um método indicativo de estabilidade para a determinação do cloridrato de prasugrel simultaneamente com seis impurezas, pesquisadores validaram metodologia por CLUE. As impurezas resultantes da síntese do fármaco neste estudo foram identificadas por CLAE-MS/MS para posterior análise em CLUE (MALATI et al., 2013).

Utilizando CLAE-MS/MS, foi desenvolvida metodologia para identificação e caracterização estrutural dos produtos resultantes da degradação forçada do cetorolaco trometamol. Neste método, nove produtos de degradação foram

identificados e caracterizados através desta técnica. A avaliação *in silico* da toxicidade destes compostos através de *softwares* prediz que três produtos de degradação apresentam alertas estruturais para carcinogenicidade (KALARIYA, et al., 2014).

Através da análise do deferasirox utilizando metodologia por CLAE previamente reportada na literatura, pesquisadores observaram a co-eluição de uma impureza na presença do fármaco. Desta forma, um novo método foi desenvolvido capaz de detectar cinco impurezas já descritas juntamente com esta nova impureza detectada. Adicionalmente, foi realizada identificação da substância desconhecida por LC-MS/MS, ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho e análise elemental (THOMAS et al., 2012).

Pesquisadores desenvolveram metodologia por CLUE-MS em tandem para determinação de 40 impurezas de síntese do fentanil, sendo que a maioria delas provenientes de duas rotas sintéticas específicas. No método desenvolvido, foram analisadas 76 amostras apreendidas de fentanil sintetizadas em locais ilícitos (LURIE et al., 2012).

Uma metodologia indicativa de estabilidade por LC-MS/MS foi desenvolvida para avaliação e caracterização estrutural de cinco produtos de degradação do cloridrato de lurasidona. Foi proposto mecanismo provável de formação dos degradados (TALLURI et al., 2015).

Quatro impurezas do febuxostate foram identificadas por LC-MS/MS e caracterizadas por espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. As impurezas identificadas foram provenientes da rota de síntese como intermediários da reação e outras também correspondiam aos materiais de partida utilizados (KADIVAR et al., 2011).

4. CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA DAS IMPUREZAS DA SITAGLIPTINA E VILDAGLIPTINA

4.

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE TRABALHO DAS IMPUREZAS DA SITAGLIPTINA E VILDAGLIPTINA

4.1. INTRODUÇÃO

A utilização de padrões de trabalho é útil em análises qualitativas e quantitativas para garantir a qualidade e pureza do composto. Adicionalmente, permite elucidar as propriedades físicas e químicas das substâncias de interesse (BUGAY, 2001).

Métodos espectroscópicos, como a espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massas são ferramentas amplamente utilizadas na identificação e elucidação estrutural de compostos orgânicos, permitindo também o controle e acompanhamento de reações ou processos de separação (LOPES e FASCIO, 2004).

Estes métodos disponíveis possuem como vantagens a redução no tempo de análise, análises em pequena quantidade de amostra, capacidade de identificar e caracterizar estruturas complexas, não destrutivas das amostras e permitem o acoplamento com métodos modernos de separação (LOPES e FASCIO, 2004).

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho auxilia na determinação da estrutura de compostos a partir de informações específicas sobre grupos funcionais, sendo útil para a análise de impurezas. Nesta técnica, a amostra é submetida à radiação eletromagnética com influência das ligações presentes na molécula (AHUJA, 2007; NAGPAL et al., 2011).

A espectroscopia na região do ultravioleta é utilizada para a caracterização tanto de impurezas quanto de produtos de degradação. É uma técnica rápida, com baixo consumo de amostra, precisa e exata. Também é adequada para uma grande variedade de entidades químicas com ampla variedade estrutural (NAGPAL et al., 2011).

A espectrometria de massas é uma técnica muito útil na caracterização de impurezas presentes em produtos farmacêuticos, fornecendo informações a respeito da estrutura das moléculas, apresentando como vantagens o baixo consumo de amostra e rapidez na análise (AHUJA, 2007; NAGPAL et al., 2011).

De forma complementar, existem outras técnicas que auxiliam na avaliação da pureza das substâncias. Dentre estes métodos, a calorimetria exploratória diferencial mede a diferença de fluxo de calor de um composto em função de um programa por aquecimento ou resfriamento, sendo amplamente utilizada no âmbito farmacêutico para determinar a pureza de fármacos, compatibilidade de compostos da formulação e identificação de polimorfos (OLIVEIRA et al., 2011).

Esta técnica não necessita de padrões de referência correspondente, sendo utilizada uma quantidade muito pequena da amostra (MATHKAR et al., 2009). Adicionalmente, analisa as propriedades térmicas dos materiais, fornecendo informações referentes às propriedades físico-químicas da substância analisada (CLAS et al., 1999; SHANTIKUMAR et al., 2014).

Com base no exposto acima, este capítulo tem por objetivo realizar a caracterização das impurezas 1 e 2 da sitagliptina, bem como das impurezas 3 e 4 da vildagliptina através das técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectrofotométricas.

4.2. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA (SQR)

As SQRs fosfato de sitagliptina, com pureza declarada de 99,5%, e 1-bromo-2,4,5-trifluorbenzeno (impureza 1 da sitagliptina), com pureza declarada de 99,3% foram adquiridos através de importação pela empresa Sequoia Researched Products (Reino Unido). A substância cloridrato de O-benzilhidroxilamina (impureza 2 da sitagliptina), com pureza declarada de 99%, foi adquirida pela empresa Sigma-Aldrich (Brasil).

A substância química de referência vildagliptina, com pureza declarada de 99,5% foi adquirida através de importação pela empresa Sequoia Researched Products (Reino Unido). As substâncias L-prolinamida (impureza 3 da vildagliptina), com pureza declarada de 98% e 3-amino-1-adamantanol (impureza 4 da vildagliptina), com pureza declarada de 96%, foram adquiridos pela empresa Sigma-Aldrich (Brasil).

As impurezas (Figura 4.1) escolhidas para realização deste estudo foram obtidas através da análise da rota sintética dos respectivos fármacos, já que tais

compostos poderiam estar presentes no produto final como contaminantes em virtude de algum processo de degradação ou por não reagirem completamente durante a síntese dos mesmos (HANSEN et al., 2005; VILLHAUER et al., 2003).

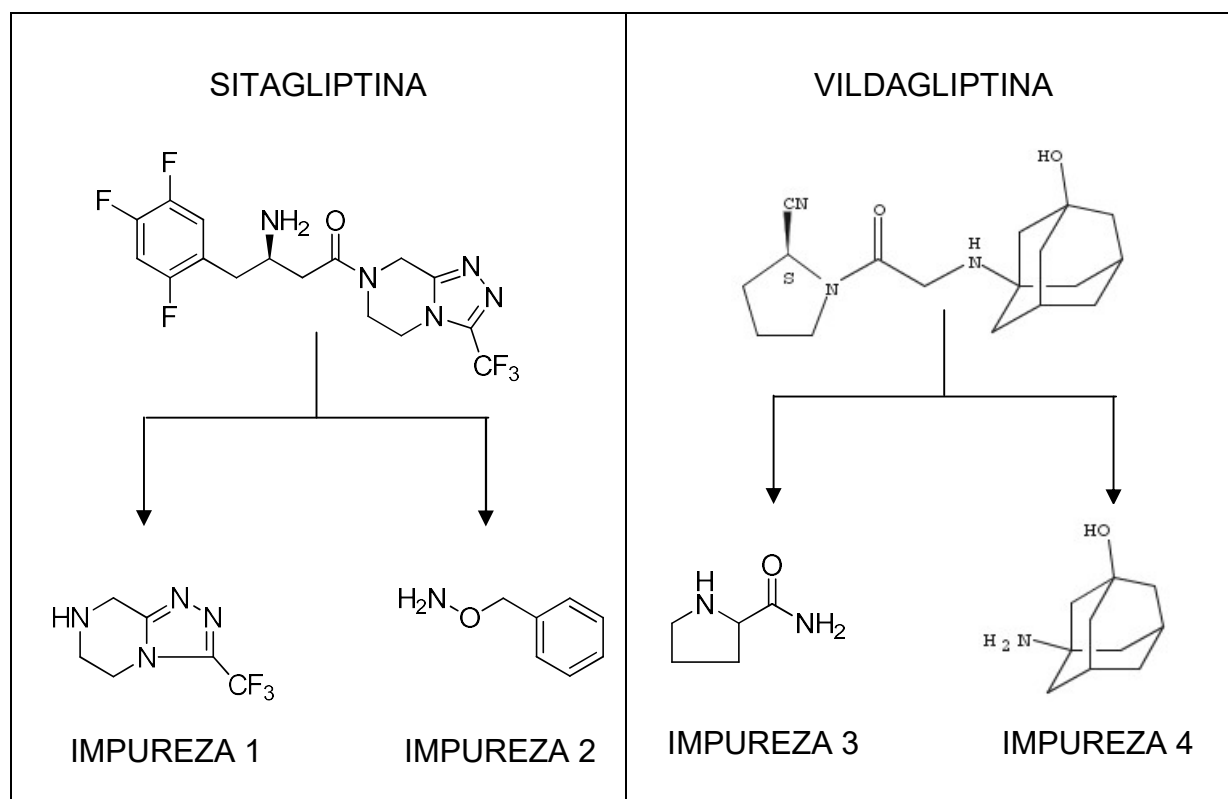


Figura 4.1 Estrutura química das substâncias utilizadas neste estudo.

4.3. PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1. Caracterização das SQRs impurezas 1, 2, 3 e 4

Para a caracterização das substâncias químicas utilizadas como referência, diferentes técnicas foram empregadas, tais como: análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC), espectrofotometria na região do infravermelho (IV), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (MS).

4.3.1.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises por DSC foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimatzu 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.

Neste ensaio, transferiu-se aproximadamente 1,0 mg das SQRs a serem analisadas para porta-amostras de alumínio, onde esta foi selada e colocada no forno do calorímetro exploratório de varredura. A rampa de aquecimento utilizada foi de 5°C/minuto e as análises foram realizadas sem prévio aquecimento para evaporação da água de hidratação.

4.3.1.1.1. Resultados e Discussão

Na Figura 4.2 está representada a rampa de aquecimento obtida por DSC para as impurezas 1 e 2.

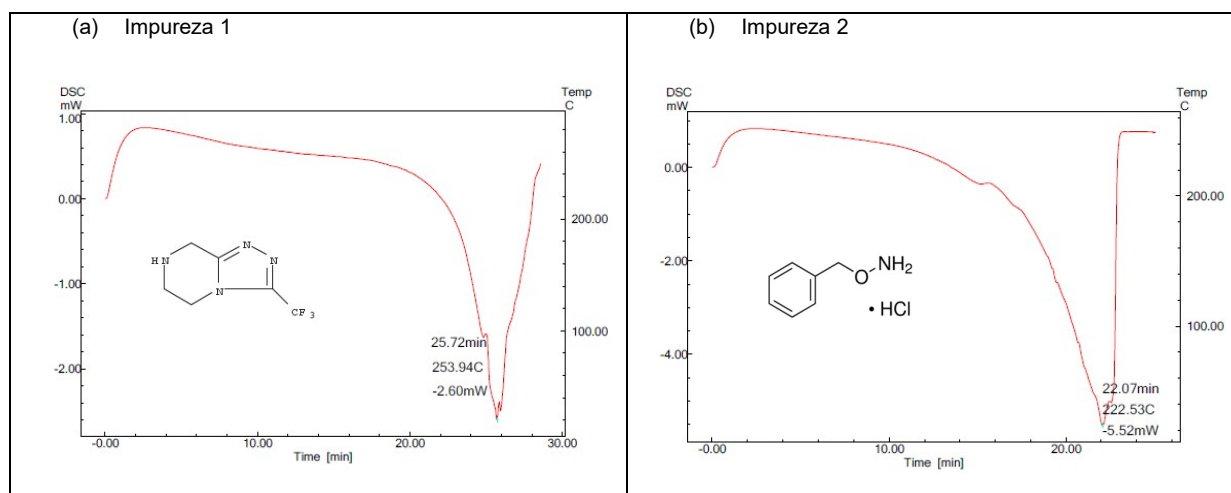


Figura 4.2. Curva de DSC das impurezas 1 e 2, obtida em fluxo de nitrogênio e rampa de aquecimento de 5°C/minuto sem prévio aquecimento para evaporação da água de hidratação.

Na Figura 4.3 está representada a rampa de aquecimento obtida por DSC para as impurezas 3 e 4.

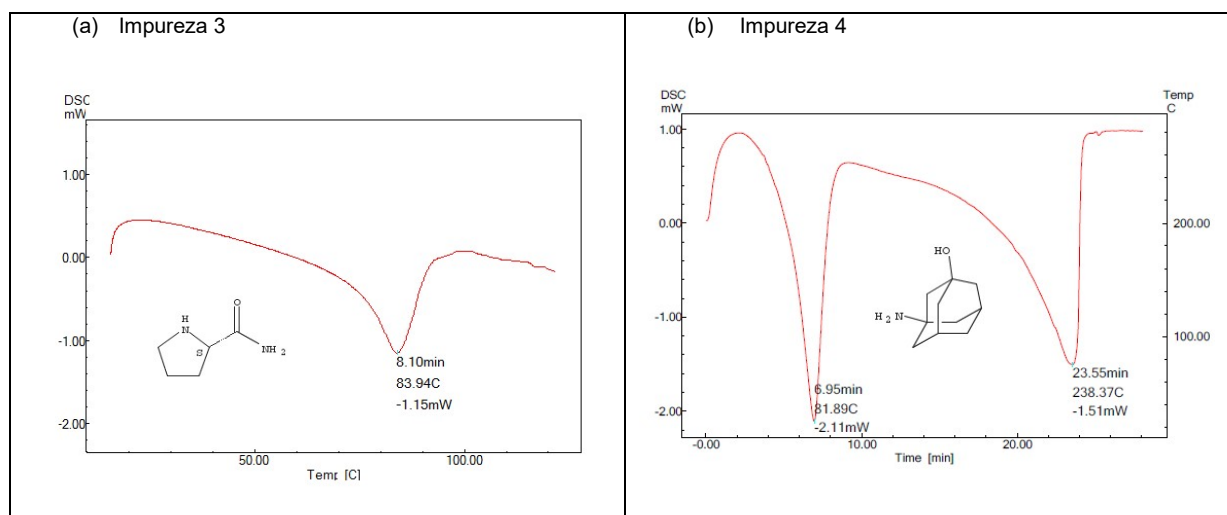


Figura 4.3. Curva de DSC das impurezas 3 e 4, obtida em fluxo de nitrogênio e rampa de aquecimento de 5°C/minuto sem prévio aquecimento para evaporação da água de hidratação.

A partir dos termogramas obtidos das substâncias referidas acima, verificou-se a inexistência de uma faixa de fusão bem definida, provavelmente, devido à decomposição dos compostos em estudo durante a fusão ou devido a presença de polimorfos. Portanto, este método analítico não se mostrou adequado para a determinação do processo de pureza das substâncias relacionadas à sitagliptina e vildagliptina (OLIVEIRA et al., 2011).

4.3.1.2. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A caracterização das SQRs das impurezas 1, 2, 3 e 4 foram realizadas, em espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX, da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

4.3.1.2.1. Resultados e discussão

Os espectros na região do IV da SQR das impurezas 1 e 2, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , encontram-se apresentados na Figura 4.4.

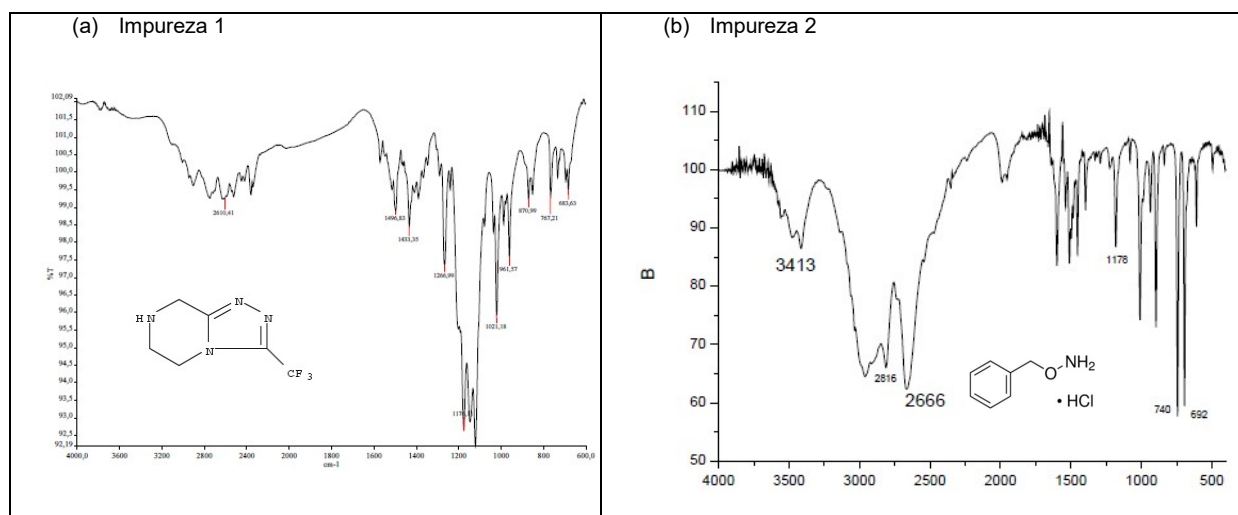


Figura 4.4. Espectros de absorção na região do infravermelho das impurezas 1 e 2.

A identificação das bandas de absorção dos principais grupamentos químicos presentes na molécula das impurezas 1 e 2 estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção das impurezas 1 e 2 e suas respectivas atribuições

	Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
	3500-3300	Estiramento da amina secundária
	1496	Dobramento da amina secundária
Impureza 1	1266	Estiramento da ligação C–N
	1690- 1640	Estiramento da ligação C=N
	1250-1100	Deformação axial CF ₃
	3500 – 3300	Estiramento da amina primária
	1640- 1560	Dobramento da amina primária
Impureza 2	3050 – 3010	Estiramento da ligação C-H
	1300 – 1100	Estiramento da ligação C-O
	900 – 690	Monosubstituição de fenila

Fonte bibliográfica: LOPES e FASCIO, 2004; PAVIA et al., 2010.

A partir dos resultados encontrados, verificou-se que os principais grupamentos químicos presentes na estrutura estão de acordo com o espectro obtido. A análise contempla o hidrocarboneto C-H, o grupo C=O, a fenila substituída e, também, o grupo NH₂.

O espectro na região do IV da SQR das impurezas 3 e 4, na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹, encontram-se apresentados na Figura 4.5.

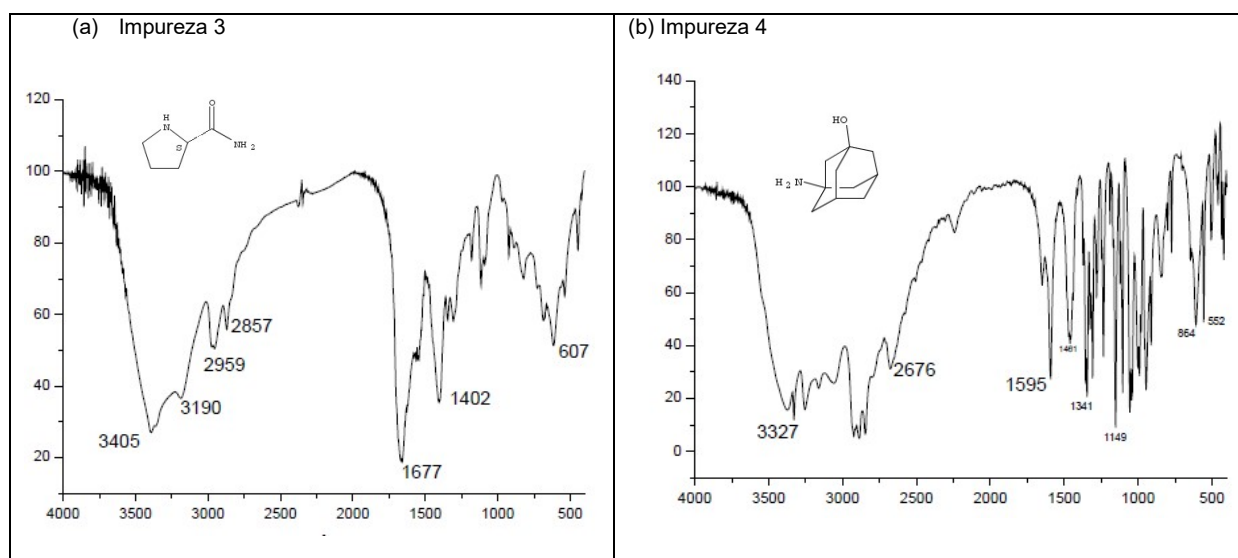


Figura 4.5. Espectro de absorção na região do infravermelho das impurezas 3 e 4.

A identificação das bandas de absorção dos principais grupamentos químicos presentes na molécula das impurezas 3 e 4 estão descritas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Frequências de absorção das principais bandas de absorção da impureza 3 e 4 e suas respectivas atribuições

	Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
Impureza 3	3500 – 3300	Estiramento da amina primária
	3500 – 3300	Estiramento da amina secundária
	3000 – 2840	Estiramento da ligação C-H
	1680 – 1630	Estiramento da ligação C=O
	1402	Dobramento da ligação CH ₂
Impureza 4	3500 – 3300	Estiramento da amina primária
	3400 – 3300	Estiramento da ligação OH
	1149	Estiramento da ligação C-O
	1461	Dobramento da ligação CH ₂
	3000 – 2840	Estiramento da ligação CH

Fonte bibliográfica: LOPES e FASCIO, 2004; PAVIA et al., 2010.

De acordo com o espectro para a impureza 3 obtido, os principais grupamentos químicos presentes na estrutura desta substância estão contemplados. Verifica-se a presença da amina, do grupo C-H e a presença da carbonila.

No espectro obtido para a impureza 4, observam-se os grupamentos característicos, tais como a função amina, o hidrocarboneto C-H e o grupo OH.

A partir dos resultados obtidos no espectrômetro de infravermelho, observam-se as posições e intensidades relativas das absorções na região do infravermelho (PAVIA et al., 2010).

Nesta pesquisa, os resultados encontrados estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula das impurezas 1, 2, 3 e 4.

As atribuições descritas na literatura pesquisada estão de acordo com os valores dos grupamentos químicos esperados para todos os compostos analisados (LOPES e FASCIO, 2004; PAVIA et al., 2010).

4.3.1.3. Espectrofotometria na região do ultravioleta (E UV)

As análises por espectrofotometria no ultravioleta foram realizadas através de E UV utilizando espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo 1800, com duplo feixe, equipado com cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico para análise espectrofotométrica das soluções. O *software* UV Probe versão 2.33 foi utilizado para o tratamento dos dados. O espectro de absorção obtido foi na faixa de 200 - 400 nm, utilizando como branco o solvente empregado no preparo das soluções.

As análises para as impurezas da sitagliptina foram realizadas utilizando a fase móvel (água com 0,05% de ácido fórmico: acetonitrila, 60:40, v/v) preparada para as análises cromatográficas, já as análises para as impurezas da vildagliptina foram realizadas utilizando água como diluente. As soluções SQR foram preparadas a partir de uma solução estoque na fase móvel contendo $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e diluída com o intuito de obter a concentração final de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.1.3.1 Resultados e Discussão

Na Figura 4.6 está representado o espectro obtido para a solução SQR das impurezas 1 e 2.

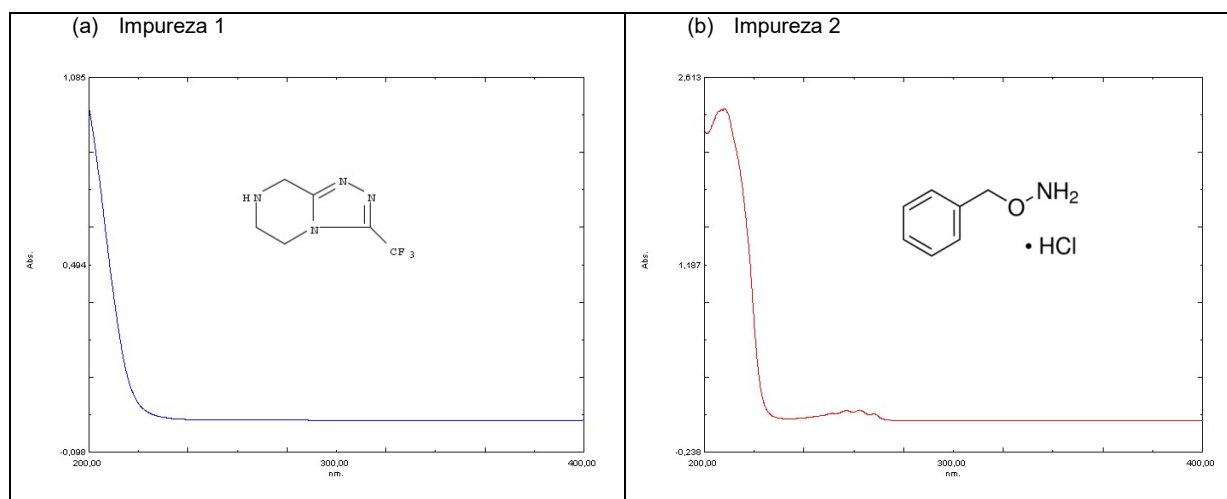


Figura 4.6. Espectro obtido na região UV na análise das impurezas 1 e 2 na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Figura 4.7 está representado o espectro obtido para a solução SQR das impurezas 3 e 4.

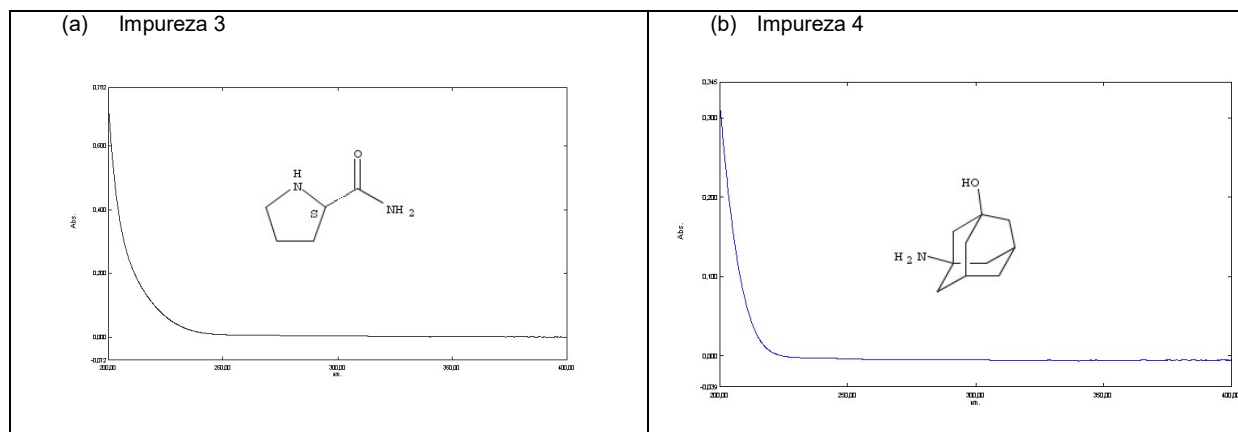


Figura 4.7. Espectro obtido na região UV na análise das impurezas 3 e 4 na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na espectroscopia do ultravioleta ocorrem transições na absorção de radiação eletromagnética em níveis de energia eletrônicos sendo que quanto maior o número de moléculas capazes de absorver luz em um determinado comprimento de onda, maior será a extensão da absorção obtida (PAVIA et al., 2010).

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que a impureza 1 possui maior absorção na região próxima a 200 nm. Este resultado está de acordo com a literatura pesquisada, visto que o composto não apresenta ressonância e os três átomos de flúor presentes na sua estrutura são retiradores de elétrons (PAVIA et al., 2010).

A impureza 2 apresenta máximo de absorção na região entre 200 a 220 nm relacionado à estrutura do anel aromático e ao grupamento substituinte O-NH_2 (PAVIA et al., 2010).

As impurezas 3 e 4 possuem baixa absorção na região próxima a 200 nm, visto que não há sistema ressonante que permita observar em comprimento de onda maior. Isso ocorre porque estas impurezas não apresentam grupos cromóforos, que corresponde ao grupo de átomos que possui energia característica de transição com absorção em comprimentos de onda acima da região de 220 nm (PAVIA et al., 2010). Embora a técnica por UV não seja confirmatória para identificação das moléculas, constitui uma alternativa relevante para determinação quantitativa dos analitos em estudo.

4.3.1.4. Espectrometria de massas

O espectro de massas foi obtido por UPLC-MS/MS, no equipamento Waters® Acquity e espectrômetro de massas Q-ToF Xevo G2 em parceria com a Universidade Federal de Santa Maria no laboratório de Química Analítica.

A detecção das substâncias químicas de trabalho foi realizada por detector com interface de ionização por *electrospray*, operado no modo positivo (ESI^+) em espectrômetro de massas marca Q-ToF Xevo G2 (Milford, MA, USA). Tensão do capilar 2,5 kV; tensão do cone de amostragem 30 V; tensão do cone de extração 3 V; temperatura da fonte 150 °C; temperatura de dessolvatação 400 °C; vazão de N_2 no cone de amostragem 20 L h^{-1} ; vazão de N_2 da dessolvatação 400 L h^{-1} ; faixa de massa monitorada 50 a 1000 Da.

4.3.1.4.1. Resultados e Discussão

O espectro de massas da SQR fosfato de sitagliptina está representado na figura 4.8.

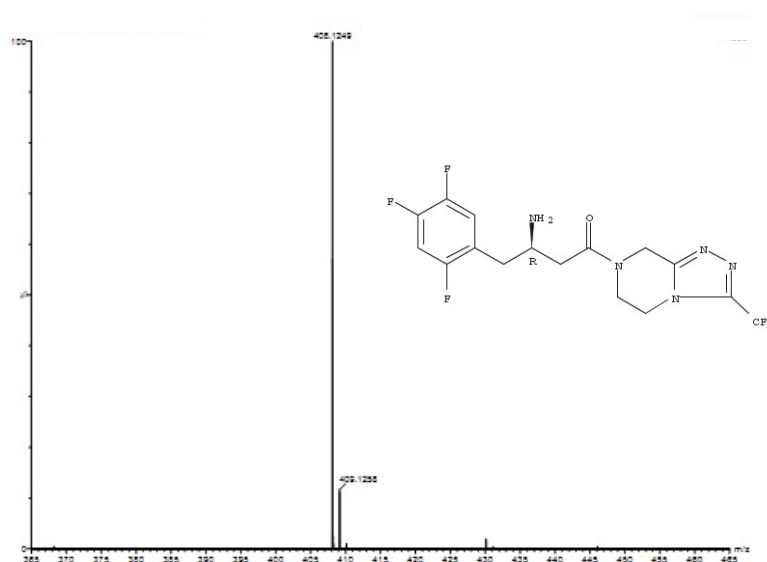


Figura 4.8. Espectro de massas da sitagliptina SQR realizada por detector com interface de ionização por *electrospray*.

O peso molecular da sitagliptina é 407 g/mol, e o pico encontrado no espectro apresenta este valor, acrescido da massa de um íon hidrogênio (H^+). Desta forma, o

fármaco sitagliptina apresenta um íon molecular de m/z 408,12 de acordo com o esperado para a sitagliptina e observado na literatura pesquisada (LANGE, 2013).

O espectro de massas da SQR impurezas 1 e 2 estão representados na Figura 4.9.

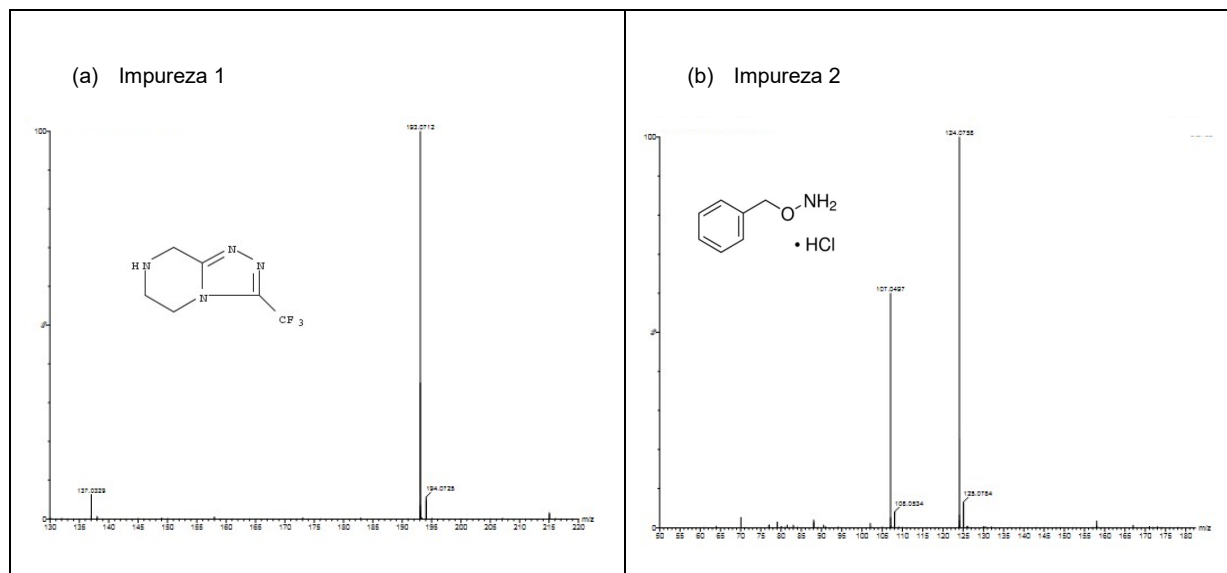


Figura 4.9. Espectro de massas das impurezas 1 e 2 realizada por detector com interface de ionização por *eletrospray*.

O espectro de massas da SQR impureza 1 apresenta um íon molecular de m/z 193,07 de acordo com o esperado para este composto, visto que seu peso molecular corresponde a 192 g/mol.

O espectro de massas da SQR impureza 2 apresentou os íons moleculares de m/z 124,07 e 107,04. O peso molecular deste composto é de 123 g/mol e está de acordo com o íon principal encontrado no espectro. O íon secundário de m/z 107,4 corresponde a uma fragmentação da impureza 2 referente à perda do grupamento amina (NH_2) presente na molécula.

O espectro de massas da SQR vildagliptina está representado na Figura 4.10.

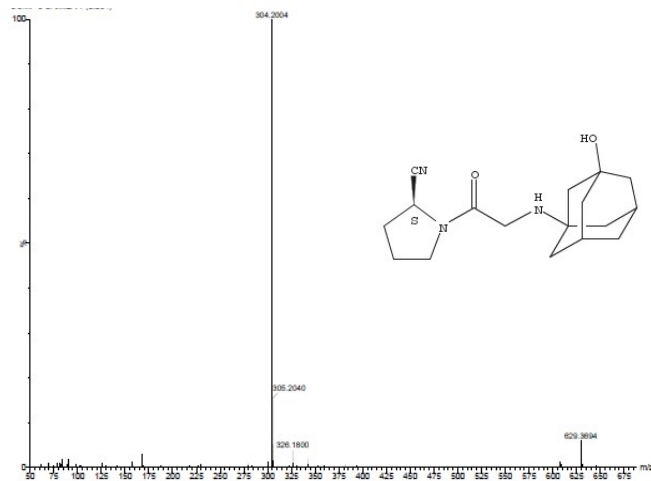


Figura 4.10. Espectro de massas da vildagliptina SQR realizada por detector com interface de ionização por *eletrospray*.

O espectro de massas da SQR vildagliptina apresenta um íon molecular de m/z 304,20 de acordo com o esperado para este fármaco, visto que seu peso molecular corresponde a 303 g/mol, confirmado pela literatura pesquisada (BARDEN et al., 2012).

O espectro de massas da SQR impurezas 3 e 4 estão representados na Figura 4.11.

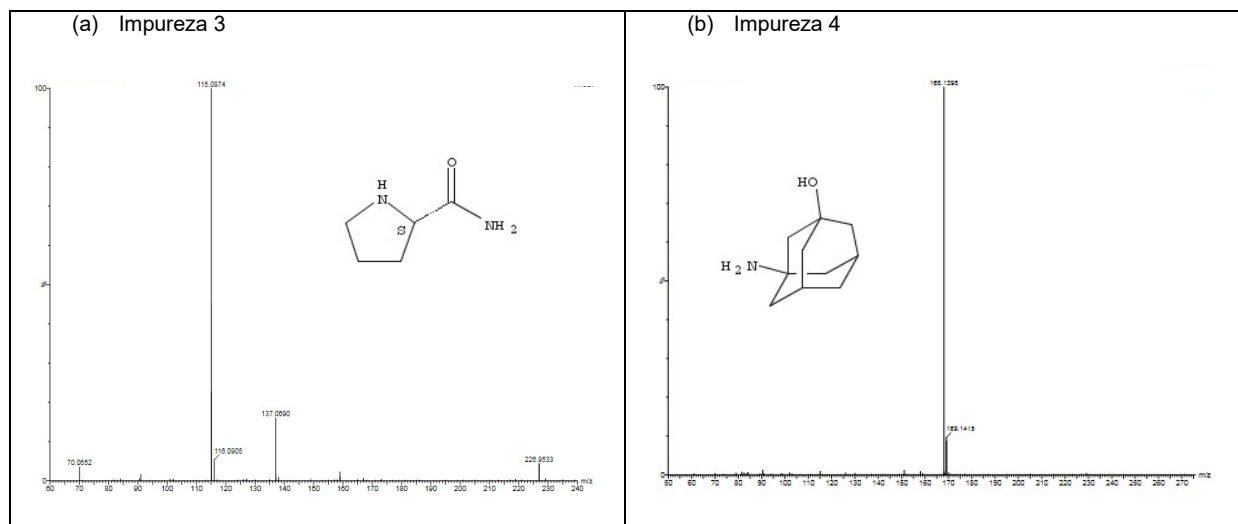


Figura 4.11. Espectro de massas das impurezas 3 e 4 realizada por detector com interface de ionização por *eletrospray*.

O espectro de massas da SQR impureza 3 apresenta um íon molecular de m/z 115,08 de acordo com o esperado para este composto já que seu peso molecular corresponde a 114 g/mol.

O espectro de massas da SQR impureza 4 apresenta um íon molecular de m/z 168,13 de acordo com o esperado para este composto, visto que seu peso molecular corresponde a 167 g/mol.

4.4. CONCLUSÕES

Na análise por DSC, a faixa de fusão encontrada nas impurezas 1, 2, 3 e 4 não se encontra bem definida, provavelmente decorrente de uma provável degradação das substâncias analisadas ou devido à presença de polimorfos;

Na análise por IV pode-se observar as bandas características de cada um dos compostos, fornecendo informações estruturais que asseguram a identidade das substâncias químicas de trabalho;

Na análise por UV foi possível observar a absorção dos compostos analisados na faixa de 200 a 400 nm, verificando que todas as impurezas apresentam absorção na região próxima a 200 nm, no qual as impurezas 3 e 4 possuem baixa absorção em comparação com as impurezas 1 e 2;

A análise por espectrofotometria de massas possibilitou a identificação de todos os compostos através da confirmação da massa molecular e perfil de fragmentação do analito;

A partir dos resultados obtidos, as substâncias foram caracterizadas com a finalidade de serem utilizadas como SQRs para posterior execução das avaliações propostas nesta tese.

**5. CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA
SITAGLIPTINA**

CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA SITAGLIPTINA

4.4. INTRODUÇÃO

A validação permite demonstrar se o método é adequado para a finalidade pretendida garantindo a confiabilidade dos resultados. Assim sendo, deve apresentar especificidade e sensibilidade, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão (BRASIL, 2003).

Os guias nacionais e internacionais fornecem subsídios para realização e condução desses testes, a fim de assegurar a confiança da metodologia desenvolvida (BRASIL, 2003; ICH-Q2(R1), 2005). De acordo com o ICH Q3A, estão descritas as especificações permitidas para qualificação de impurezas de fármacos sintetizados quimicamente (ICH-Q3A(R2), 2006).

Durante a síntese de um fármaco, os subprodutos oriundos da interação entre os reagentes juntamente com a dificuldade em isolar o composto sintetizado comprometem a pureza do ativo. Desta forma, o método analítico deve apresentar sensibilidade e especificidade adequada para o propósito (HOLM e ELDER, 2016).

Diversos métodos estão sendo utilizados para a avaliação das impurezas. A capacidade de separação dos compostos e alta sensibilidade do equipamento estão entre os requisitos necessários (AHUJA, 2007). Em relação às impurezas, a CLAE em fase reversa com detecção UV é a técnica mais amplamente utilizada (GÖRÖG, 2007; HOLM e ELDER, 2016).

Tanto laboratórios de controle de qualidade de indústrias como os de pesquisa utilizam a CLAE que já se encontra bem estabelecida e referenciada (GUMUSTAS et al., 2013). A escolha do método analítico para determinação de impurezas orgânicas da sitagliptina baseou-se em trabalhos anteriores realizados neste mesmo grupo de pesquisa que utilizaram o CLAE gerando resultados satisfatórios de acordo com os objetivos propostos.

Desta forma, as condições do método e os resultados obtidos nesta pesquisa possibilitaram a análise das substâncias de interesse.

O objetivo deste segundo capítulo foi identificar, separar e quantificar a sitagliptina bem como suas principais impurezas de síntese utilizando a CLAE, técnica amplamente utilizada nas indústrias farmacêuticas, e que permite o controle da qualidade da sitagliptina, fármaco recente no tratamento da diabetes e cuja literatura não apresenta estudos referentes a este escopo de análise.

5.2. ARTIGO CIENTÍFICO I: DETERMINATION OF SITAGLIPTIN IN PRESENCE OF ITS ORGANIC IMPURITIES USING BOX-BEHNKEN EXPERIMENTAL DESIGN FOR ROBUSTNESS ASSESSMENT

Submetido para publicação no periódico Die Pharmazie

5. 2. DETERMINATION OF SITAGLIPTIN IN PRESENCE OF ITS ORGANIC IMPURITIES USING BOX-BEHNKEN EXPERIMENTAL DESIGN FOR ROBUSTNESS ASSESSMENT

Camila Ferrazza Alves Giordani, Sarah Campanharo, Nathalie Ribeiro Wingert, Lívia Maronesi Bueno, Joanna Wittckind Manoel, Cássia Virginia Garcia, Nadia Maria Volpato, Elfrides Eva Scherman Schapoval, Martin Steppe
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Abstract

When a new process is developed, raw materials, intermediates, reagents or solvents can react with each other generating byproducts or impurities. The presence of these unwanted materials, even in small amounts, can influence pharmaceutical efficacy and safety. A simple HPLC method was developed and validated for the quantitative determination of sitagliptin and its organic impurities from the synthesis process. The method was carried out in an XBridge™ Phenyl column (250 mm X 4.6 mm i.d., 5 µm) with a mobile phase consisting of acetonitrile: formic acid (0.05% aqueous solution) mixture (40:60, v/v), with isocratic elution. Flow rate was 1.0 mL/min and detector wavelength was 207 nm. The validation process, in accordance with international guidelines, shows that the method was linear ($R^2 = 0.9997-0.9999$) and ANOVA showed a non-significant linearity deviation ($p > 0.05$). Precision RSD was <4% (n=6) and method accuracy ranged between 97.52-102.85%. Limits of detection (1.4 and $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) and quantification (2.8 and $2.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) were determined for impurities 1 and 2, respectively. Critical factors were selected to examine method robustness with a three-level Box Behnken experimental design and no significant factors were detected. The HPLC method for impurity determination in sitagliptin was precise, accurate and robust. The separation of the compounds presented an adequate resolution even in the presence of the main degradation product proving to be effective for routine analyses in the pharmaceutical industry.

Keywords: Sitagliptin phosphate, drug impurities, liquid chromatography, method validation

1. INTRODUCTION

Control and evaluation of impurities in the pharmaceutical industry are essential to ensure the quality, safety and efficacy of drug development. The assessment of an impurity profile through identification and quantification has received significant attention from regulatory authorities and several pharmacopoeia have incorporated limits with regard to permissible levels of impurities present in the formulations (Roy 2002; Argentine et al. 2007; Nagpal et al. 2011; Raman et al. 2011; Holm and Elder 2016). Constant surveillance of drug impurities is necessary as they may have many implications on population health, including teratogenic and mutagenic potential, and carcinogenic effects (Ahuja 2007; Bercu et al. 2009; Balasubrahmany et al. 2012).

Therefore it is necessary to establish methods that can contribute to the improvement of quality control, safety and efficacy of drugs to identify and quantify impurities which can influence the therapy and health of patients undergoing chronic treatments.

Among the diseases which require continuous treatment, diabetes mellitus type 2 has a complex pathophysiology and its pharmacotherapy requires a drug combination to maintain basal glucose levels in the blood (Duez et al. 2012; Neumiller and Setter 2012; Irons and Minze 2014). The gliptin class is one of the drug therapies used for diabetes mellitus type 2 and there are few studies on evaluation and quantification of its impurities. Sitagliptin (STG) is part of this group and acts by inhibiting the DPP-4 enzyme, which enhances the action of incretins, allowing the maintenance of glucose levels (Duez et al. 2012; Neumiller and Setter 2012).

Due to the small number of papers regarding the identification and quantification of impurities related to STG, combined with the fact that it represents substantial consumption in current therapy, the development and research of analytical methods is a relevant contribution to ensure reliability and safety in the chronic use of these drugs for an effective treatment of type 2 diabetes mellitus.

Researchers described a product of STG alkaline degradation which is also part of its synthetic pathway and the active metabolite of the drug: 3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro [1,2,4] triazolo [4,3a]pyrazine. The structure was elucidated by different spectroscopic techniques and it corresponds to impurity 1 of this paper. The

determination of STG, metformin and the STG alkaline degradation used high performance liquid chromatography (HPLC) with the detection of 220 nm and run time program of 15 minutes (El-Bagary et al. 2011). Another research study developed a stability-indicating HPLC method of STG tablets using detection at 207 nm as in the case of this search. The main degradation product was obtained by UV-C light, cytotoxicity test by LDH of this product using mononuclear cells to show a toxic effect at concentrations above $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Lange et al. 2012). PERAMAN and coworkers (2013) simultaneously evaluated STG and metformin stability in pharmaceutical dosage forms using HPLC and the run time analysis was 38 minutes. This method detected fifteen degradation products; four of these structures have been identified where one of them corresponds to impurity 1 of this research (Peraman et al. 2013).

Recently, a research developed a methodology by HPLC for evaluation of process impurities and degradants of STG, but the analysis time was 65 minutes in a gradient model (Vuyyuru et al. 2017).

No published research is available for separation and quantification of STG and its main impurities of synthesis in the presence of major degradation product by UV-C light so far. Until now, no research was performed with impurity 2 of this study.

Impurity profiling by analytical methodology in new drug substances is a key piece of the current guidelines and the most important issues in recent pharmaceutical analysis. This is similar to forced degradation studies which supply information on possible degradants and intrinsic stability of the drug substance (Jain and Basniwal 2013). In this case, the impurities were selected according to the synthesis route.

Statistical design of experiments (DoE) was applied to evaluate the analytical method robustness by multifactorial approach. It allows a smaller number of experiments and also provides a better understanding of the effect of controllable variables on critical parameters. The assessment of method robustness is essential to verify the statistical significance of critical factors and their interactions on the experimental region and method parameters. In order to accomplish a well fitted DoE, the number of factors must be considered (Ferreira et al. 2017). Although robustness assessments of analytical methods are commonly conducted using inexpensive techniques such as Plackett-Burman, the reduced number of controllable

factors to be modeled allowed the application of the Box-Behnken design with a small number of experiments (Cavazzuti 2013).

In accordance with international demand and the need for pharmaceutical industries to qualify their products, this paper aims to use the HPLC technique to determine STG and its main synthesis impurities (Figure 1) in order to obtain the best analytical methodology. Additionally, the use of the Box-Behnken design allows evaluating the modifications made in the parameters and the interaction that occurs between them.

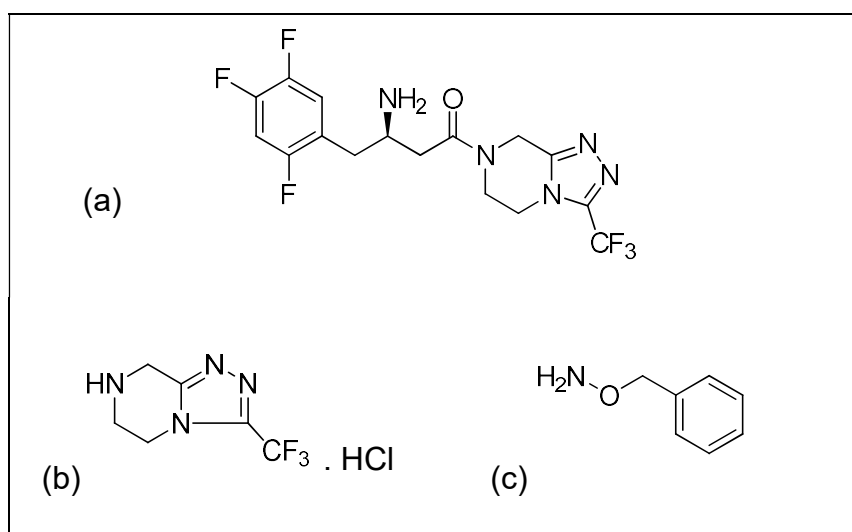


Figure 1. Chemical structures of sitagliptin (a), impurity 1 (b) and impurity 2 (c).

2. RESULTS AND DISCUSSION

The pharmacological and toxicological profile is responsible for the safety of a drug and its adverse effects may be caused by impurities present in the drug. Accordingly, it is important to monitor and control impurities to ensure quality and safety of a drug by the analytical activities that represent a key component of modern pharmaceutical analysis (Jain and Basniwall 2013). Regulatory agencies are increasingly attentive to this issue and have sought different strategies in order to ensure the quality and safety of pharmaceutical preparations (ICH Q3AR2 2006; ICH Q3BR2 2006).

Among the pharmaceutical techniques, HPLC is extensively used in order to have high resolution, reproducible responses, easy instrument operation and data analysis with adaptability to major procedures (Gumustas et al. 2013).

The main objective of the chromatographic method was to achieve the separation of STG from its two impurities with adequate detection at trace levels. The ability to separate and quantify it in the presence of major degradation product improves the method and allows the control of the pharmaceutical formulation.

Reported stability-indicating HPLC method for the determination of STG revealed that fast drug degradation was observed in UV-C light and the basic, oxidative, thermal and photolytic conditions also detected degradation products but not as fast as UV-C light (Lange et al. 2012). This literature used a C8 column, mobile phase of water with 0.3% of triethylamine pH 4 and acetonitrile (75:25, v/v) at 207 nm (Lange et al. 2013).

Our research started with this condition but all compounds remain very close to each other and changing the pH ratio of the mobile phase does not provide better results. Using a C18 column under the same conditions tested before, impurities do not interact with the column, probably because of polarity. After, changing the mobile phase to water with 0.1% of formic acid pH 3.5 and acetonitrile, all compounds were at the same retention time.

The literature shows that in reversed phase HPLC, a stationary phase with less polarity and a mobile phase with greater polarity are strongly applied to separate solutes with different polarities. In this case, drug and impurities are polar and it is necessary to change the stationary phase in order to provide enough separation with an adequate resolution between all the substances.

Testing the phenyl column, water with 0.1% formic acid and acetonitrile with changes in proportions of mobile phase, the best condition found was 60% aqueous phase with separation of drug and its impurities in short analysis time and acceptable system suitability (resolution, theoretical plates, symmetry and retention factor). Mobile phase was applied to dilute samples.

The method was validated according to ICH guidelines (ICH Q2R1 2005) and specificity was evaluated by comparing the chromatograms of the STG and its impurities with a simulated excipient mixture (Figure 2). It was found that the excipients in the formulation do not interfere in the analysis of STG and impurities and there is no additional peak eluting at the same retention time. Additionally, impurities do not interfere with the detection of STG. A chromatographic peak purity tool demonstrated that they were pure in all cases. Since STG and its two impurities

peaks could not be attributed to any other peak, the method is confirmed suitable for analysis.

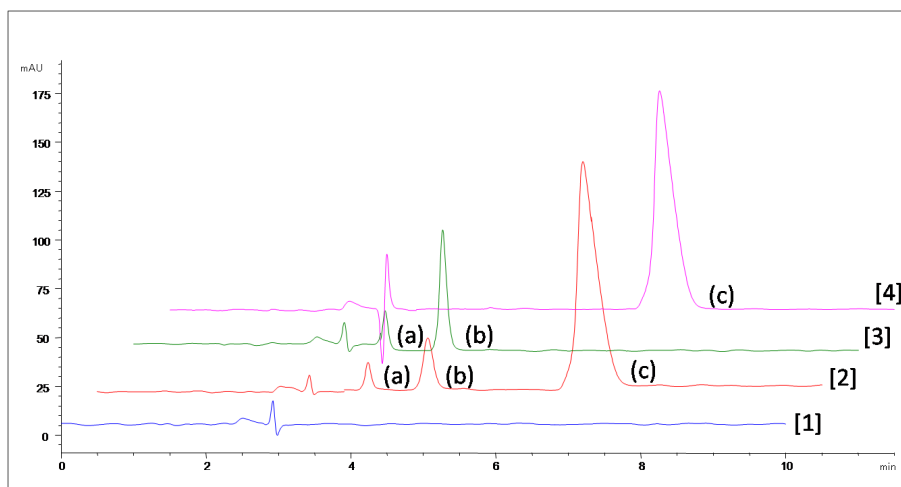


Figure 2. Chromatogram of simulated excipient mixture [1]; standard preparation of impurity 1 - 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (a), impurity 2 - 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (b) and sitagliptin - 60.0 $\mu\text{g/mL}$ (c) with simulated excipient mixture [2]; standard preparation of impurity 1 - 10.0 $\mu\text{g/mL}$ (a) and impurity 2 - 10.0 $\mu\text{g/mL}$ (b) [3]; standard preparation of sitagliptin - 60.0 $\mu\text{g/mL}$ (c) [4].

The STG main photodegradation product (Lange et al. 2012) was tested and it also does not interfere in the analysis of STG and its impurities (Figure 3) and it elutes at distinct retention times demonstrating the selectivity of the method which is also useful for quality control in the pharmaceutical industry.

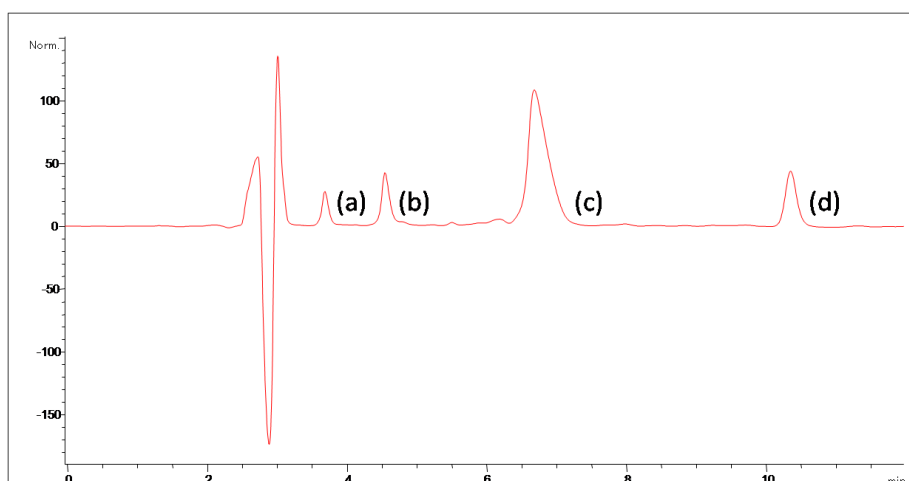


Figure 3. Chromatogram of standard preparation of impurity 1 - 15.0 $\mu\text{g/mL}$ (a), impurity 2 - 15.0 $\mu\text{g/mL}$ (b) and sitagliptin - 60.0 $\mu\text{g/mL}$ (c) in the presence of a main degradation product (d).

The high resolution attained allows preparing solutions of the STG drug at an elevated concentration. This increases the possibility of analysis by the pharmaceutical industry since impurities are only present in trace levels.

In the literature, researchers developed the first method for simultaneous determination of STG and metformin by HPLC in the presence of alkaline degradation product of STG and elucidation of the structure by different spectroscopic techniques presents the same chemical structure of impurity 1 used in this study. It can be present as impurity of synthesis or degradation product.

Similarly, PERAMAN (2013) and researchers developed a stability-indicating liquid chromatographic method for simultaneous analysis of STG and metformin with detection of fifteen degradation products and the structures of four are elucidated where two belong to the degradation of STG (Peraman et al. 2013). One of these chemical structures is like impurity 1 and the other presented a structure similar to impurity 2 present in this study.

Analytical methods developed for impurity analysis must have the highest sensitivity possible for the detection and quantification of trace levels of these contaminants in drug samples. The LOD, LOQ, and RSD of LOQ values determined for two impurities of STG are reported in Table 1. In this case, the values obtained were very low among the values established for international guidelines (ICH Q3AR2 2006).

Table 1. Limits of detection, quantification and relative standard deviation of impurities 1 and 2. Linearity of sitagliptin and its impurities.

Limit of detection		Limit of quantification		RSD* of LOQ	
Impurity 1	Impurity 2	Impurity 1	Impurity 2	Impurity 1	Impurity 2
1.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3.38	3.64
Linearity					
		Slope	Intercept	R^2	
Sitagliptin		36.953	-0.331	0.9999	
Impurity 1		14.056	4.801	0.9997	
Impurity 2		54.907	-13.331	0.9999	

*Relative standard deviation of the areas at LOQ.

The analytical method proposed is sensitive enough to measure small amounts of impurities in order to ensure the quality and safety of pharmaceutical

formulations together with the high resolution found in the chromatogram. Additionally, RSD obtained for impurities 1 and 2 for limit of quantification is much smaller than 10%. This qualifies the method since these are drug impurities that allow quantification with reproducibility.

According to official guideline specifications, the limits of detection and quantification acquired are below the reporting threshold considering the amount of drug substance administered per day (ICH Q3BR2).

The linearity standard plot for the assay method was obtained over the concentration ranges tested, ie, 5.0- 65.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for STG, 3.0- 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for impurity 1 and 2.5- 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for impurity 2. All determination coefficient obtained were greater than 0.999. The results are within the acceptance criteria (ICH Q2R1 2005) and demonstrate that there is a correlation between peak area and concentration of analytes confirming linearity (Table 1) (ICH Q2R1 2005). ANOVA showed a non-significant linearity deviation ($p>0.05$). LANGE and co-workers used concentrations of 70.0 to 130.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for linearity of STG, PERAMAN and collaborators [2013] studied in the ranges 50- 450 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for metformin and 10-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for STG. New methodology developed use smaller concentrations with satisfactory results and suitable for the proposed objective. Results are in agreement with other methodologies used to quantify STG and other drugs (El-Bagary et al. 2011; Lange et al. 2012; Peraman et al. 2013).

RSD for STG sample assay in the method repeatability study was 2.14% and RSD for the area of impurities were 1.21% and 2.46% for impurity 1 and 2, respectively. Assay RSD obtained in intermediate precision study are reported in Table 2. These results confirmed that the method was precise and demonstrated that the two data analyses were in agreement. These findings show that they are in accordance with researchers who analyzed STG using different analytical methods (El-Bagary et al. 2011; Lange et al. 2012; Peraman et al. 2013).

Recovery of STG ranged from 101 to 103% and ranged from 97% to 99% for impurities 1 and 2. In the equation used the results were obtained by theoretical concentration and area of standard. The deviation from the theoretical recovery is small and the condition for mean recovery in this validation is met. The results obtained in other studies were similar to this research and although the limit for impurities can be higher for the small concentration used, the findings were similar (El-Bagary et al. 2011; Lange et al. 2012; Peraman et al. 2013).

Table 2 – Data intraday and interday precision and data on accuracy

Intraday (n = 6)			
	Sitagliptin (%)	Impurity 1 (%)	Impurity 2 (%)
Mean	100.60	98.4	100.88
RSD	2.14	1.21	2.46
Interday (n = 18)			
	Sitagliptin (%)	Impurity 1 (%)	Impurity 2 (%)
Mean	99.9	98.57	98.43
RSD	2.03	1.69	3.2
Accuracy			
	Taken ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)
Sitagliptin	10.0	10.29	102.85
	20.0	20.38	101.90
	30.0	30.80	102.66
Impurity 1	3.0	2.96	98.83
	5.0	4.89	97.76
	10.0	9.99	99.87
Impurity 2	3.0	2.97	98.86
	5.0	4.88	97.52
	10.0	9.79	97.94

Robustness of an analytical method is a dimension of its capability to remain unchanged by small, but deliberate changes in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage (Cavazutti 2013). Temperature, flow rate, and percentage of ACN in mobile phase were selected and small changes performed. The effect of those changes on STG and impurities 1 and 2 assay, area, and area RSD was assessed. Results are presented as coefficient plots that show the significance of factors evaluated by DoE. Whenever the confidence interval bar crosses zero, the factor is considered non significant for the parameter assessed.

Currently, several researches have used the Box Behnken experimental design to evaluate the robustness and it proved to be effective for the proposed objective (Ragonese et al., 2002; Beg et al., 2012; Hasnain et al., 2013). Figure 4 demonstrates that modifications of chromatographic factors do not significantly alter the method capacity to quantify STG, impurity 1 and impurity 2 accordingly.

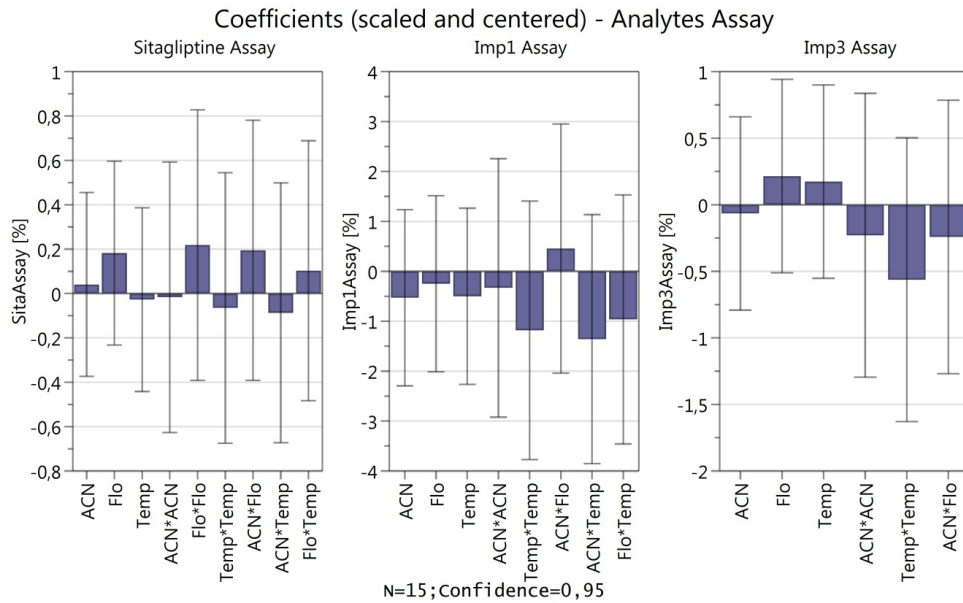


Figure 4. Effect of variations on ACN %, flow and temperature of sitagliptine and impurities assay. Uncertainty bar crossing y=0 represents non significant factors ($\alpha=0.05$).

RSD assay values for STG and impurities 1 and 2 were assessed throughout the Box Behnken experimental design. Figure 5 shows that there is no significant variation in RSD responses for quantification of STG, Impurity 1 and Impurity 2.

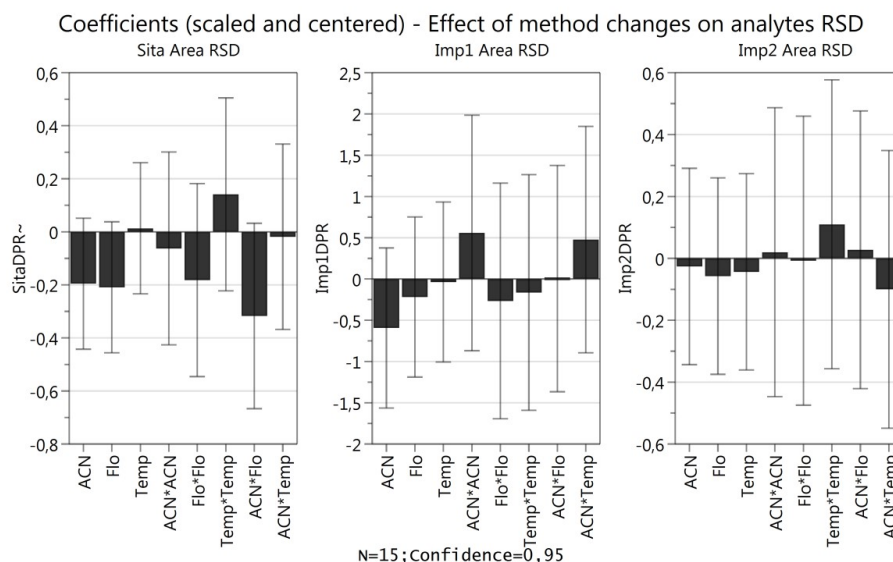


Figure 5. Evaluation of the effect of variations on the analytical method for the sitagliptin and impurities assay. Uncertainty bar crossing y=0 represents non significant factors ($\alpha=0.05$).

Applying Box-Behnken to evaluate method robustness it was found that “Flow rate” is the factor with a very significant effect on area values for STG and impurities 1 and 2 (Figure 6). These findings are in accordance with chromatography theories, since the increase in mobile phase flow rate causes a reduction in the area value because peak width is reduced and absorptivity remains the same.

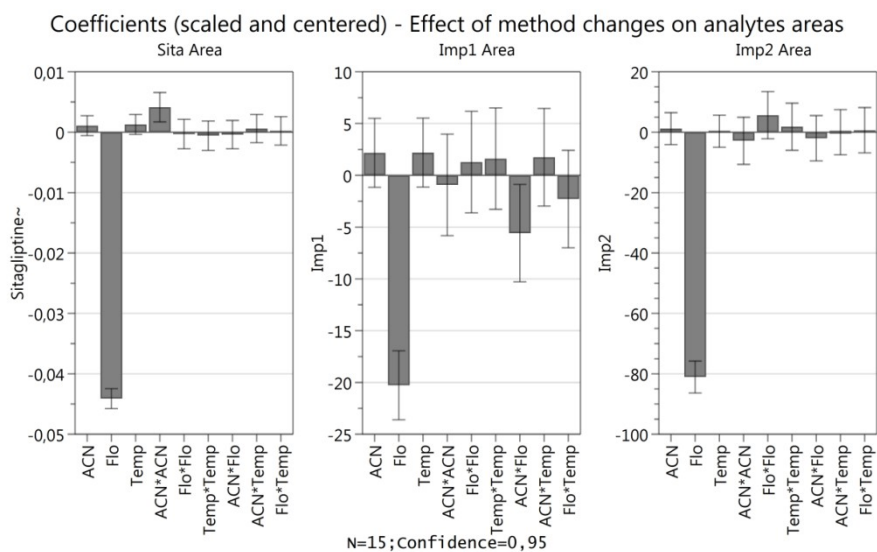


Figure 6. Evaluation of the effect of pre-defined variations on the analytical method.

According to the statistical analysis of results of the Box-Behnken design, it could be ensured that some parameters such as temperature, flow, and percentage of organic solvent (acetonitrile), under the observed range, are not statistically significant for the accurate detection and quantification of STG and its impurities of synthesis (1 and 2). The Box-Behnken model design was evaluated by ANOVA for regression and residual analysis. It was found statistically significant and with no lack of fit ($\alpha=0.05$) for all checked parameters, being suitable to assess method robustness.

Analysis of system suitability shows that assessed parameters (Table 3) were within the acceptable range, indicating that the method developed is suitable for the intended analysis.

Table 3 – Data of system suitability

Parameters	Sitagliptin	Impurity 1	Impurity 2
Retention time	7.35	3.86	4.89
Resolution	8.96	6.33	4.91
Theoretical plates	6366	7729	8969

3. EXPERIMENTAL

3.1 Chemicals

STG phosphate reference standard (99.5%) and 3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4] triazolo [4,3-a] pyrazine-HCl (99,3%) (impurity 1) were supplied by Sequoia Research Products (Oxford, UK). O- benzylhydroxylamine hydrochloride (99%) (impurity 2) was supplied by Sigma-Aldrich (Brazil). Januvia® tablets, STG 50 mg (Merck Sharp & Dohme) were purchased from the local market. Inactive ingredients are microcrystalline cellulose, magnesium stearate, lactose and sodium starch glycolate. All chemical reagents were pharmaceutical or analytical grade. Purified water was obtained by Millipore® Direct-Q 3UV (Molsheim, France). Mobile phase was filtered through 0.45 μm cellulose acetate membranes (Sartorius Stedim Biotech, Germany) and the solutions for injection were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Vertical Chromatography, Jatujak, Bangkok, Thailand) before use.

3.2 Instrumentation and analytical conditions

An Agilent liquid chromatograph (Santa Clara, CA, USA) model LC- 1220 series, equipped with a Q 1311A quaternary pump, ALS-G1329A auto sampler, TCC-G1316A column oven, G1315B photodiode array detector, G1322 A degasser and ChemStation manager system software was used in the analytical scale studies. Separations were obtained in an XBridge™ Phenyl column (250 mm X 4.6 mm d.i., 5 µm). Mobile phase consisted of isocratic elution based on acetonitrile: formic acid (0.05% aqueous solution, pH 3.0) mixture (40:60, v/v). The flow rate was 1.0 mL min⁻¹, time run 8 minutes and in the presence of the main degradation product the time run was 12 minutes, injection volume 20 µL, detection wavelength 207 nm.

3.3 Preparation of reference standards and sample solutions

3.3.1 Reference standard solution

Stock standard solutions of STG, impurity 1 and impurity 2 were prepared by accurately weighing 10 mg, transferred to a 20 mL volumetric flask and diluted to volume with mobile phase, in order to obtain 500 µg mL⁻¹ of STG, impurity 1 and impurity 2. Stock solutions were stored at 2-8 °C protected from light.

3.3.2 Sample solution

Tablets containing 50 mg of STG were accurately weighed and crushed to thin powder. Appropriate amounts were transferred to a 20 mL volumetric flask. Then, 15 mL of methanol were added, followed by 30 minutes in UltraSonic Cleaner USC-2850, methanol were added to final volume. The solution was filtered through a 0.45 µm membrane filter. For analysis, an appropriate aliquot from STG stock solution (100 µg mL⁻¹) was diluted to appropriate concentration in mobile phase.

3.4 Method validation

The chromatographic method was validated considering the following parameters: specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ),

precision, accuracy and robustness. Parameters were analyzed in this study according to international guidelines (ICH Q2R1 2005; ICH Q3A 2006).

3.4.1 Specificity

This parameter was evaluated by analysing the interference of formulation inactive ingredients with the STG, impurities 1 and 2 by comparing the chromatograms obtained from STG and impurities 1 and 2 reference standards and simulated sample of excipients.

3.4.1.1 Degradation by UV-C light

Sample solutions of STG (1.0 mg mL^{-1}) dissolved in methanol were placed in closed 1cm^3 quartz cells and placed in a UV chamber (100 x 18 x 17cm) with internal mirrors and CSR F30W T8 UV fluorescent lamp emitting radiation at 254 nm for 4 hours. Before the final study, samples were diluted to $100.0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ with mobile phase and analyzed by HPLC.

3.4.2 Limits of Detection (LOD) and Quantification (LOQ)

LOD and LOQ for impurities were determined at a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively, by injecting a series of diluted solutions with known concentrations. The precision study was also carried out at the LOQ level by injecting six ($n = 6$) individual preparations and calculating the area RSD.

3.4.3 Linearity

Standard curves were prepared at seven concentration levels of STG (5, 15, 25, 35, 45, 55, 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$), impurity 1 (3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and impurity 2 (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Linearity was evaluated by linear regression analysis and ANOVA (analysis of variance) ($\alpha = 0.05$) for compliance of the linear model.

3.4.4 Precision

Method precision was verified by repeatability and by intermediate precision. Repeatability was checked by injecting six individual preparations of STG ($50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) spiked with its two impurities ($15.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) and placebo. The detected concentration for each impurity was calculated. Intermediate precision of the method was also evaluated using different analysts and performing the analysis on three different days.

3.4.5 Accuracy

Assay method accuracy was evaluated in triplicate for $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of STG standard spiked with 5.0, 15.0 and $25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the drug product. Drug product recovery was calculated for each added concentration.

For impurities, solutions with placebo and impurities 1 and 2 at 3.0, 5.0 and $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared. Each solution was prepared in triplicate and the values expressed as the percentage ratio of mean experimental concentration and theoretical concentration.

3.4.6 Robustness

Box-Behnken was the experimental design chosen to evaluate the effect of small chromatographic variations on parameters related to analyte quantification and system suitability. Temperature, flow rate, and percentage of ACN were selected as critical factors for method robustness assessment. The center points of the two level response surface design were the optimized values for each factor, further -1 and +1 levels were as follows: ACN (38 and 42 %); flow rate (0.9 and 1.1 mL/min); temperature (24 and 26 °C). DoE was modeled and results processed using MODDE Pro 11 statistical software (MKS Umetrics, Sweden).

3.4.7 System Suitability

System suitability tests are used to check if the chromatographic system is able to perform the intended analysis and if it is capable of providing acceptable, good quality results. It verifies the availability and suitability of the chromatographic system (Wahlich and Carr 1990; USP 34 2011).

The parameters measured were: resolution (R), theoretical plates (N), and retention time. It can be determined experimentally from the result of one or more experiments (Heyden et al. 2011).

4. CONCLUSION

The development of new drugs is a challenge for researchers since few studies are available in literature. The present study was able to detect and quantify STG synthesis impurities at low levels, which is very important when analyzing small amounts of new drug substances. The isocratic HPLC method developed for quantitative analysis of STG and its main impurities is precise, accurate, linear, robust and specific. This method exhibited an excellent performance in terms of sensitivity and speed, even though it used small concentration of impurities. For the robustness test none of the changes performed significantly altered the expected results. According to official guidelines, drugs such as STG and its main synthetic products, an analytical study is required to evaluate the raw material and the finished product in order to supply the demands of quality control in the pharmaceutical industries. The isocratic HPLC method is suitable and can be allocated for routine analysis of sample production and to check the quality of STG.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS:

This research has no conflict of interest and does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil, for financial support.

REFERENCES

AHUJA S (2007) Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced drug delivery reviews* 59: 3-11.

ARGENTINE M, OWENS P, OLSEN B, (2007) Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 12-28.

BALASUBRAHMANYAM E, BHALME M, KUMAR SL, RAO SS, RAVI P, REDDY VK (2012) Evaluating impurities in drugs- Part III. *Pharmaceutical Technology* 36: 76-86.

BERCU JP, DOBO KL, GOCKE E, McGOVERN TJ (2009) Overview of genotoxic impurities in pharmaceutical development. *International Journal of Toxicology* 28:468-478.

CAVAZZUTI M (2013) *Optimization Methods: From Theory to Design*. Springer Berlin Heidelberg.

DUEZ H, CARIOU B, STAELS B (2012) DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology* 83: 823-832.

EL-BAGARY R, ELKADY EF, AYOUB BM (2011) Liquid chromatographic determination of sitagliptin either alone or in ternary mixture with metformin and sitagliptin degradation product. *Talanta* 85: 673-680.

FERREIRA SLC, CAIRES AO, BORGENS TS, LIMA AMDS, SILVA LOB, SANTOS WNL (2017) Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal* 131:163-169.

GUMUSTAS M, KURBANOGU S, USLU B, OZKAN SA (2013) UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia* 76:1365-1427.

HEYDEN YV, NIJHUIS A, SMEYERS-VERBEKE J, VANDEGINSTE BGM, MASSART DL (2011) Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24:723-753.

HOLM R, ELDER DP, (2016) Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 87: 118-135.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2005) Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1).

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2006) Impurities in New Drug Substances Q3A(R2).

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2006) Impurities in New Drug Products Q3B(R2).

IRONS B, MINZE MG (2014) Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 7:15-24.

JAIN D, BASNIWAL PK (2013) Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 86: 11-35.

LANGE ADC, GASPERIN FT, PASSOS CS, TODESCHINI V, VOLPATO NM, SCHAPOVAL EES (2012) Stability-Indicating LC Assay with Determination of System Suitability Limits by a Robustness Test for Sitagliptin in Tablets and Assessment of Cytotoxicity for Degradation Products. *Current Pharmaceutical Analysis* 8: 360-369.

NAGPAL S, KARAN, UPADHYAY A, BHARDWAJ TR, THAKKAR A (2011) A review on need and importance of impurity profiling. *Current Pharmaceutical Analysis* 7: 62-70.

NEUMILLER JJ, SETTER SM (2012) Review of linagliptin for the treatment of type 2 diabetes. *Clinical Therapeutics* 34: 993-1005.

PERAMAN R, GOWRA CS, REDDY YP, PERURU KK (2013) Stability- indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and sitagliptin phosphate in dosage forms. *Chromatographia* 76: 1153-1162.

RAMAN NVVSS, PRASAD AVSS, REDDY KR (2011) Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 662-667.

ROY J, (2002) Pharmaceutical impurities – a mini review. *AAPS PharmSciTech* 3: 1-8.

The United States Pharmacopoeia USP 34 (2011), United States Pharmacopoeial Convention, Rockville.

WAHLICH JC, CARR GP (1990) Chromatographic system suitability tests – what should we be using?. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 8: 8-12.

**5. CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA
VILDAGLIPTINA**

6. CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DA VILDAGLIPTINA

6.1. INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, as indústrias farmacêuticas procuram suprir as limitações encontradas nos equipamentos principalmente com o objetivo em reduzir custos e aumentar a produtividade. Neste contexto, a CLAE passou a apresentar limitações fazendo com que se buscassem novas técnicas e alternativas para sanar as necessidades existentes (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

O surgimento da CLUE, que é muito semelhante à técnica por CLAE, emprega partículas menores que 2 μm em sistemas com alta pressão. Desta forma, tem-se um aumento na resolução e detectabilidade com diminuição no tempo de análise (MALDANER e JARDIM, 2009).

Aliado a isso, as técnicas acopladas contribuem e qualificam o sistema operacional. O sistema LC-MS (cromatografia líquida-espectrometria de massas) apresenta melhoria na resolução, detecção, sensibilidade e seletividade e rapidez nas análises (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2013).

Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de análise colabora e aprimora o avanço de novas tecnologias gerando melhorias durante a pesquisa e também na análise de novos fármacos (LEE, 1999).

Na sequência, torna-se necessário realizar a validação da metodologia analítica, que tem por objetivo garantir a confiabilidade dos resultados mostrando a adequabilidade do método para a finalidade desejada (BRASIL, 2003). As regulamentações especificam a maneira de execução da análise, descrevendo os passos para realização do ensaio (BRASIL, 2003; ICH-Q2(R1), 2005).

Durante a validação e avaliação dos resultados, a interpretação e compreensão das análises devem ser ajustadas para cada procedimento analítico individualmente, a fim de saber se o procedimento desenvolvido é adequado para a finalidade pretendida (ERMER, 2005).

Desta forma, a utilização do CLUE-MS/MS para avaliação de impurezas é uma importante ferramenta analítica em virtude da maior sensibilidade e capacidade de selecionar a massa exata do analito de interesse.

Portanto, este capítulo teve por objetivo realizar a determinação quantitativa para a análise da vildagliptina e suas principais impurezas de síntese. Este capítulo está apresentado em formato de artigo científico e a codificação dos analitos encontra-se distinta do capítulo I, referente à caracterização das impurezas da vildagliptina.

6.2. ARTIGO CIENTÍFICO II: UPLC-ESI/Q-TOF MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF VILDAGLIPTIN AND ITS ORGANIC IMPURITIES USING FULL FACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN FOR ROBUSTNESS ASSESSMENT

Artigo a ser submetido ao periódico Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

UPLC-ESI/Q-TOF MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF VILDAGLIPTIN AND ITS ORGANIC IMPURITIES USING FULL FACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN FOR ROBUSTNESS ASSESSMENT

Camila Ferrazza Alves Giordani ¹, Sarah Campanharo ¹, Nathalie Ribeiro Wingert ¹, Livia Maronesi Bueno ¹, Joanna Wittckind Manoel ¹, Cássia Virginia Garcia ¹, Nadia Maria Volpato ¹, Gabrielle Dineck Iop ², Paola de Azevedo Mello ², Érico Marlon de Moraes Flores ², Elfrides Eva Scherman Schapoval ¹, Martin Steppe ¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

²Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Abstract

Vildagliptin (VLG) correspond to a drug used for the treatment of diabetes mellitus. This disease require a continuous treatment and the control of impurities present in it are so important to assure the quality of this drug. By this, it is necessary to use sensitive and selective detection techniques and the ultra performance liquid chromatography (UPLC) is a better option compared to high performance liquid chromatography (HPLC) witch enhance the separation efficiency with short analysis time and increased resolution. The analysis of this research was conducted using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and quantification was performed using extracted ion of drug VLG and its main organic impurities of synthesis. During the validation process, in accordance with international guidelines, the method proved to be linear ($R^2 = 0.997-0.998$) and ANOVA showed a non-significant linearity deviation ($p > 0.05$). Three critical factors were selected to examine method robustness with a Full Factorial experimental design and the responses were found to be not significant for quantification of VLG and the respective impurities. The UPLC-MS/MS for determination of impurities in VLG was precise, accurate and robust proving to be effective for analysis in the pharmaceutical industry and improve the quality, safety and efficacy of the new drug developed.

Keywords: vildagliptin, drug impurities, UPLC-MS/MS, method validation

1.

Introduction

The type 2 diabetes mellitus (DM2) is a disease characterized by high glucose levels resulting from insulin resistance or the decrease in insulin secretion (1). The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (DPP-4) is a new class of drugs used for the treatment of this disease and vildagliptin (VLG) belong to this class.

The control and evaluation of impurities of the new developed drugs by the pharmaceutical industry are fundamental for quality, safety and efficacy. This subject is receiving important attention by regulatory authorities and different pharmacopoeias have incorporated the limits to the permissible levels of impurities present in drug (2).

Several methods were described for prepare VLG and this synthesis generally uses L-prolinamide (impurity 1) and 3-aminoadamantanol (impurity 2) for starting material which can remain as potential impurities (3).

In addition, there are a small number of studies regarding identification and quantification of impurities of VLG. Studies about the development of analytical methods for organic impurities of drugs correspond to an important contribution in order to ensure safety and reliability mainly in case of a substantial consumption of drugs in chronic use like DM2.

Impurities of drugs must be characterized and this evaluation by analytical methods is a key component in current pharmaceutical analysis (4). The presence of these compounds even in small quantities can implicate the efficacy and safety of the pharmaceutical products and also, it can be unusually potent or toxic (2).

Search of VLG in literature report the elucidation of structure of an impurity obtained from new synthesis of VLG and their respective degradation product (5). Another research developed an analytical method using high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of VLG in presence of 3-amino-1-adamantanol (6) and other paper evaluate metformin, VLG and 3-amino-1-adamantanol in plasma using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) (7). The development of a methodology using liquid chromatography was evaluated for determination of VLG tablet and also determined the molecular structure of one main degradation product (8).

EI Bagary and collaborators developed a method by UPLC-MS/MS for simultaneous determination of metformin and VLG in presence of 3-amino-1-

adamantanol (Figure 1[c]) in human plasma, but that analysis did not quantify this compound and it is the first time that this main impurity synthesis of VLG are validated for quantitative determination (7).

For drug impurities, various analytical techniques are used for improvements of specificity, sensitivity or robustness. The use of UPLC compared to HPLC reduce separation times, enhancing selectivity and separation efficiency (9).

The reduction of particles in the stationary phase at UPLC technique increase efficiency and peak capacity with shorter analysis time and better resolution. In that system, the use of MS/MS detector improve the sensitivity of detection and the source ionization is more efficient due to enhanced peak concentrations and reduced chromatographic dispersion at lower flow rates compared to HPLC (10; 11; 12).

The use of MS as a detector improve the methodology developed for qualitative and quantitative analysis of several compounds. The responses obtained are sensible and peak probably consists of a pure compound which the quality of spectral information is improved up to a 20-fold (11).

Researchers developed and compare the separation of a five component mixture of tablets and capsules in order to evaluate the efficiency of HPLC and UPLC methods. The find shows that UPLC was a faster method, 3-fold reduction in elution time, less consumption of solvents and higher efficiency (13).

During the validation of a new analytical methodology, the robustness test allows the evaluation of potential sources of variability of responses of the method (14). In this case, the use of design of experiments (DoE) for robustness allows to perform a minimal number of analysis of well-planned experiments (15) and the measured of multiple responses without extra experiments that arrive at the desired objective (16).

DoE allows an effective and efficient approach in order to evaluate simultaneously the effects of factors and their interactions. It is able to predict the relationship between the factors (17).

The full factorial design evaluate the linear influence of the individual factors and those interactions (15). It determines the significance of main effects and their interactions without confounding between them (18).

The present study aimed the development of analytical methods for quantitative determination of the main synthesis impurities of VLG (Figure 1) for quality control analysis using UPLC-MS/MS and the use of Full factorial design

allows the evaluation of modifications made in the parameters and the interaction that occurs between them.

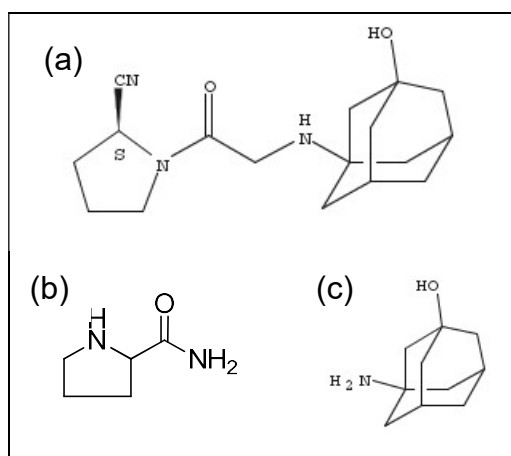


Figure 1. Chemical structures of VLG (a), impurity 1 (b) and impurity 2 (c).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

VLG standard (99.5%) was supplied by Sequoia Research Products (Oxford, UK). 2-pyrrolidinecarboxamide (98%) (impurity 1) and 3-amino-1-adamantanol (96%) (impurity 2) were supplied by Sigma-Aldrich (Brazil). Galvus® tablets, VLG 50 mg (Novartis Biociências SA) were purchased from the local market. Inactive ingredients are microcrystalline cellulose, magnesium stearate, lactose and sodium starch glycolate. All chemical reagents were of pharmaceutical or analytical grade. Purified water was obtained by using Milli-Q system from the Millipore® (Bedford, MA, USA).

2.2. Instrumentation and analytical conditions

Chromatographic analyses were performed by the ACQUITY™ UPLC system from Waters Corp. (Milford, MA, USA) equipped with sampler manager, column heater, quadrupole time of flight (Q-ToF) MS detector, and binary solvent manager. A ACQUITY UPLC® BEH C8 (Ireland) column (2.1x50 mm, 1.7 μm) was used for the separation of components. The Q-ToF Xevo G2 mass spectrometer (Milford, MA,

USA) was equipped with an electrospray ionization source (ESI). ESI-MS and ESI-MS2 detections were performed in positive ion mode and resolution mode. Optimized MS conditions were: capillary voltage 2.50 kV, cone voltage 30 V, extractor cone 3 V, desolvation gas 400 L/h, cone gas 10 L/h, desolvation temperature 400 °C, source temperature 120 °C. Acquisition mass range was monitored from 50 to 1000 Da. System control and data acquisition were performed using MassLynx V 4.1 software. Elution was performed with binary gradient where solution A composed of water with 0.1% formic acid and solution B of methanol containing 0.1% formic acid, the column temperature was maintained at 35°C, injection volume was 1 µL and the mobile phase flow was 0.3 mL/min. The gradient program was as follows: time/% solution A:0/100, 2/80, 3/0.

2.3. Robustness: design of experiments

Full factorial design was the experimental design chosen to evaluate the effects of small chromatographic variations on parameters related to analyte quantification and system suitability. Temperature, flow rate and injection volume were selected as critical factors for method robustness assessment. The center points of the two level response surface design were the optimized values for each factor, further -1 and +1 levels were as follows: temperature (33 and 37 °C); flow rate (0.2 and 0.4 mL/min); injection volume (0.9 and 1.1 µL). DoE was modeled and results processed using MODDE Pro 11 statistical software (Umetrics, Sartorius Stedim, Sweden).

2.4. Preparation of standard and sample solutions

2.4.1. Standard solution

The stock standard solution of VLG, impurity 1 and impurity 2 were prepared by accurately weight 10 mg, transferred to a 20 mL volumetric flask and diluted to volume with methanol, in order to obtain 500 µg mL⁻¹ of VLG, impurity 1 and impurity 2. The stock solutions were stored at 2-8 °C protected from light and diluted with water and methanol containing 0.1% formic acid (1:1, v/v).

2.4.2. Sample solution

Tablets containing 50 mg of VLG were accurately weighted and crushed to thin powder. Appropriate amounts were transferred to a 20 mL volumetric flask and diluted to volume with methanol in order to obtain $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ of VLG. The solution was filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter. The stock solutions were stored at $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$ protected from light and diluted with water and methanol containing 0.1% formic acid (1:1, v/v).

2.5. Experimental conditions

Tests were performed in isocratic or gradient mode using different ratios of water, acetonitrile or methanol, varying column, flow and temperature. The column used were ACQUITY UPLC® BEH C8 (50 x 2.1mm; $1.7 \mu\text{m}$), ACQUITY UPLC® BEH C18 (50 x 2.1mm; $1.7 \mu\text{m}$), ACQUITY CSH Phenyl-Hexyl (50 x 2.1mm; $1.7 \mu\text{m}$) and ACQUITY UPLC® BEH Amide (50 x 2.1mm; $1.7 \mu\text{m}$).

Using the Phenyl-Hexyl column, the flow were varied to 0.1 at $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the temperature to 25 at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in a several gradient mode of water and acetonitrile.

For the C18 column the flow was from 0.15 to $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and temperature to 35 at $50 \text{ }^\circ\text{C}$. The mobile phase used correspond to water and acetonitrile with variations in pH value of organic solvent from 7.0 to 10.0 with NH_4OH 50 mM or pH 4.0 with 0.1% of formic acid. Methanol also was tested in pH 8.0 with NH_4OH 50 mM or pH 5.0 with 0.1% of formic acid. Modification in pH of water for 8.0 was performed with NH_4OH 50 mM.

The amide column was used and variations performed in flow was from 0.15 to 0.4, for temperature correspond to 35 at $65 \text{ }^\circ\text{C}$ where the mobile phase was composed of water and acetonitrile with variations in pH of organic solvent for 8.0 with NH_4OH 50 mM or 5.0 with 0.1% of formic acid.

The column C8 was tested with variations in flow to 0.15 at 0.4, temperature from 35 to $55 \text{ }^\circ\text{C}$ and modifications in gradient mode was performed with water as aqueous phase and acetonitrile or methanol as organic solvent.

This last column was used for the analysis and the mobile phase was composed of water and methanol containing 0.1% formic acid, the temperature was maintained at 35 °C and the flow used was 0.3 mL/min.

2.6. Method validation

The chromatographic method was validated taking into consideration the following parameters: specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy and robustness. Parameters were analyzed in this study according to international guidelines (19; 20).

2.6.1. Specificity

This parameter was measured by analysing the interference of the inactive ingredients of the formulation with VLG, impurities 1 and 2 by comparing the mass chromatograms obtained from VLG, impurities 1 and 2 standard and simulated sample of excipients.

2.6.2. Limit of Detection and Quantification

The LOD and LOQ for impurities were determined at a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively, by injecting a series of diluted solutions with known concentrations.

2.6.3. Linearity

The standard curve was prepared from VLG stock solutions at five concentration levels of 5, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The standard curves from impurities 1 and 2 were prepared from stock solutions at five concentration levels of 1, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The peak area versus concentration data was treated by least-squares linear regression analysis. The correlation coefficients, slopes, and Y-intercepts of the standard curve were determined.

2.6.4. Precision

The precision of the method was verified by repeatability and by intermediate precision. Repeatability was checked by injecting six individual preparations of VLG tablets ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) spiked with its two impurities ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and placebo. Relative standard deviation (% RSD) of peak area for each impurity was calculated. The intermediate precision of the method was also evaluated using different analysts and performing the analysis on three different days.

2.6.5. Accuracy

The accuracy of the assay method was evaluated in triplicate for $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of VLG SQR and 5, 10 and $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of the tablets concentration. Calculated amounts of know tablets were added to the sample preparation to attain the lowest levels. The recovery of the tablets were calculated.

For the impurities, assay method was evaluated in triplicate for $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of placebo and VLG standard with 10, 15 and $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of each impurity concentration. The recovery of the impurities were calculated.

3. Results and discussion

The main objective of the chromatographic method was to achieve the separation of VLG from its two impurities in a short time with adequate separation and able to quantify those impurities in order to ensure safety and quality of pharmaceutical formulations.

The major synthesis impurities of VLG used in this research do not present chromophore above the region of 220nm, by this, an equipment with UV detection is not possible to use since its necessary to detect traces of impurities present in the drug.

In this case, UPLC-MS/MS is a new equipment with very sensibility and suitable for analysis of impurities. It has been an innovative methodology that ensure an adequate resolution in reduced time of analysis and the mass detector allows the correct selection and confirmation of analytes of interest. By this, VLG positive ion generated a MS chromatogram peak in 3.23 min correspondent to MS peak, $[\text{M}+\text{H}]^+$,

m/z 304,2025; impurity 1 positive ion generated a MS chromatogram peak in 0.46 min correspondent to MS peak, $[M+H]^+$, m/z 115,0871; impurity 2 positive ion generated a MS chromatogram peak in 1.61 min correspondent to MS peak, $[M+H]^+$, m/z 168,1388.

In order to obtain the best chromatographic conditions, various parameters were tested to provide adequate sensitivity and retention factor.

The main problem during development of the method was the high polarity and similarity of chemical compounds structure. It difficult to separate the substances and in some cases, for the condition tested the retention time was near to the dead time.

Despite varying the rate of organic solvent, pH of aqueous phase, different temperature and flow of mobile phase with several types of columns, the compounds remain eluting very close to each other at isocratic mode.

Tests realized using fenilhexyl column in a gradient mode, varying the ratios of organic solvent do not result in an adequate separation and the retention time were very close with similar chromatographic behaviour because of similarity in their structures.

The amide column also were tested and besides the variations realized, the compounds do not present adequate peak symmetry and retention time begins very close to each other.

Analysis performed in C18 column with differents conditions tested shows that peak symmetry of the substances were not adequate. The use of ammonium hydroxide 50 mM in water pH 8.0 provide adequate separation, but it was not reproducible.

More tests were performed in C8 column with satisfying results and slow modifications in ratios of organic solvent or water, temperature and flow of the mobile phase result in the best chromatographic conditions. The use of acetonitrile as organic solvent was not adequate for the separation and change it for methanol ensure that the method reproduce with adequate peak sensitivity and retention factor for quantification of the drug and impurities. Mobile phase was used as a diluent of the samples.

Starting from this condition, preliminary studies were performed in order to identify the variables with major effects on the system for evaluate the range and magnitude of variation of each factor with the objective to obtain a reliable analytical method.

In the robustness test, the potential sources of variability were evaluated in order to know what factor must be controlled during the execution of the method (14).

Experimental design was selected to examine the factors and designs applied of two-level screening allow to evaluate a large number of factors in a small number of experiments (14).

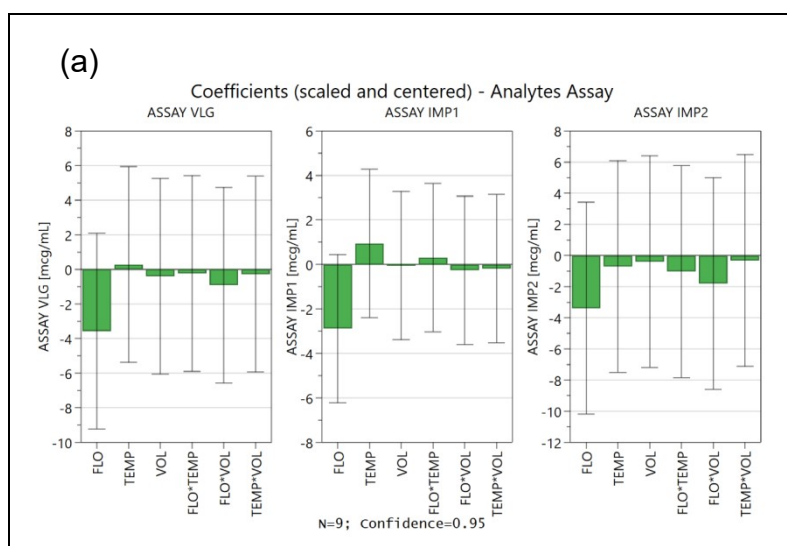
Temperature, flow rate and injection volume were selected as critical factors for method robustness assessment. The effect of those changes on VLG and impurities 1 and 2 assay, area RSD of area were assessed.

The results obtained are presented as coefficient plots that show the significance of factors measured by DoE. When the confidence interval bar crosses zero, the factor is considered non significant for the parameter assessed (21).

Figure 2a demonstrates that modifications of chromatographic factors do not alter the method capacity to quantify VLG, impurity 1 and impurity 2.

The effect of method changes on analytes areas (Figure 2b) and retention time (Figure 2c) evaluated by full factorial design shows that “Flow rate” is the factor with significant effect for time of VLG, impurity 1 and impurity 2. In general, the increase in mobile phase flow rate reduces the area values because peak width is reduced, but it do not implicate negatively in the quantification of the analytes (22). Therefore, this performance in the analysis do not interfere in the results.

Similarly, the increase in flow rate reduces the retention time of VLG, impurity 1 and impurity 2. This result was also report by researchers who evaluated the variation of flow rate in the separation of two mixtures of neutral pesticides in HPLC and it shows that the separation is facilitated by higher flow rates and the time of analyses was reduced (23).



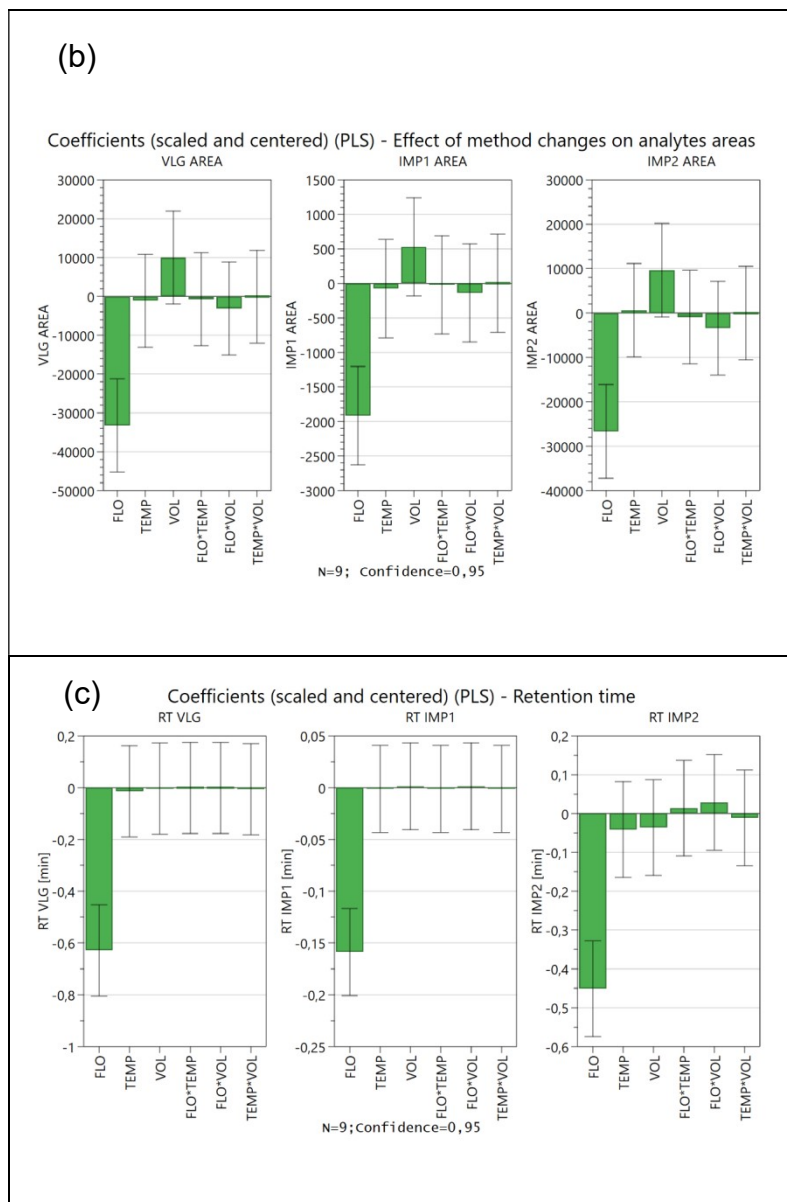


Figure 2. (a) Effect of variations of VLG and impurities assay. (b) Effect of variations for the VLG and impurities areas. (c) Effect of VLG and impurities retention time. Uncertainty bar crossing $y=0$ represents non significant factors ($\alpha=0.05$).

The response surface plots (Figure 3) of VLG, impurity 1 and impurity 2 confirm the results shown in the graphs (Figure 2) concerning the effect of changes performed in temperature and flow rate to the retention time of the analytes. The resulting values demonstrate method robustness and adequability.

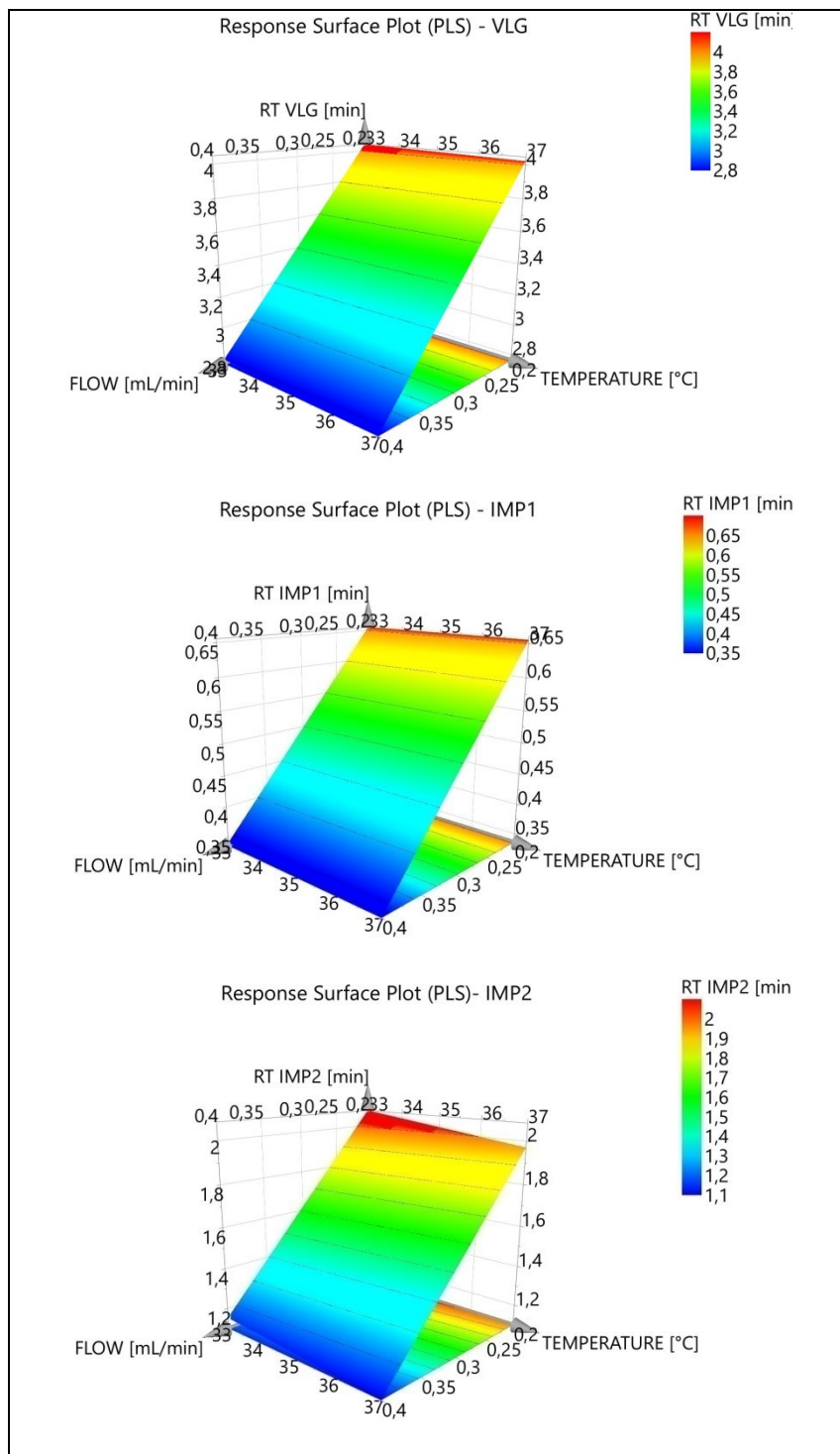


Figure 3. Response surface plot of VLG, impurity 1 and impurity 2.

The summary of fit plot (Figure 4) shows the adjustment of the statistical model to the study performed. A significant model has the correlation coefficient (R^2) greater than 0.5, whereas the model predictive power (Q^2) must be higher than 0.1 (24). In this case, the values of R^2 and Q^2 founded show that the statistic model used presents significance for the values obtained.

From the obtained results it is observed that the values are in agreement with the expected and it shows that the applied statistical model is suitable for the proposed objective.

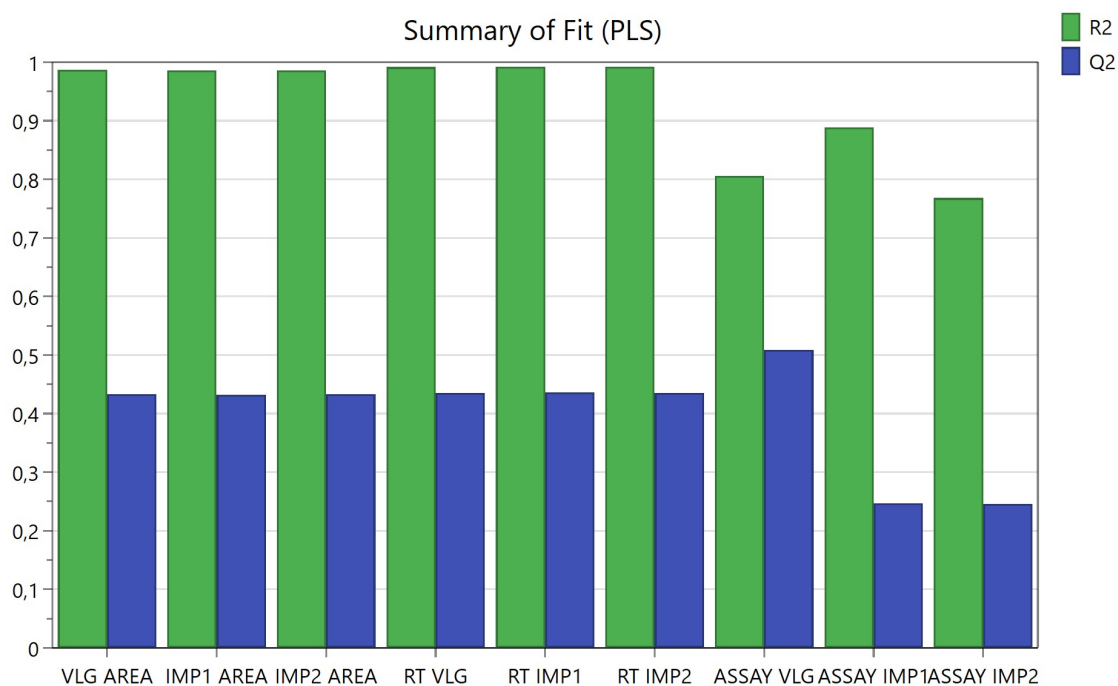


Figure 4. VLG area ($R^2=0.99$; $Q^2=0.43$), impurity 1 (IMP1) area ($R^2=0.99$; $Q^2=0.43$), impurity 2 (IMP2) area ($R^2=0.99$; $Q^2=0.43$), RT (retention time) VLG ($R^2=0.99$; $Q^2=0.43$), RT IMP1 ($R^2=0.99$; $Q^2=0.44$), RT IMP2 ($R^2=0.99$; $Q^2=0.44$), assay VLG ($R^2=0.81$; $Q^2=0.51$), assay IMP1 ($R^2=0.89$; $Q^2=0.25$), assay IMP2 ($R^2=0.77$; $Q^2=0.25$).

The tests made it possible to determine the best analytical conditions for subsequent validation of the analytical method and it was validated according to ICH guideline (ICH-Q2 (R1), 2005). Method specificity was evaluated by comparing the chromatograms of the VLG and its impurities with simulated excipient mixture (Figure 5). The presence of excipients in the formulation do not cause any interference in the analysis of VLG and its impurities and no additional peak eluting at the same retention time was found. The mass spectrometer demonstrated that all compounds were pure in the chromatogram. Since the VLG and its two main

impurities peak could not be attributed to any other peak, the method is confirmed as highly suitable and specific for the analysis.

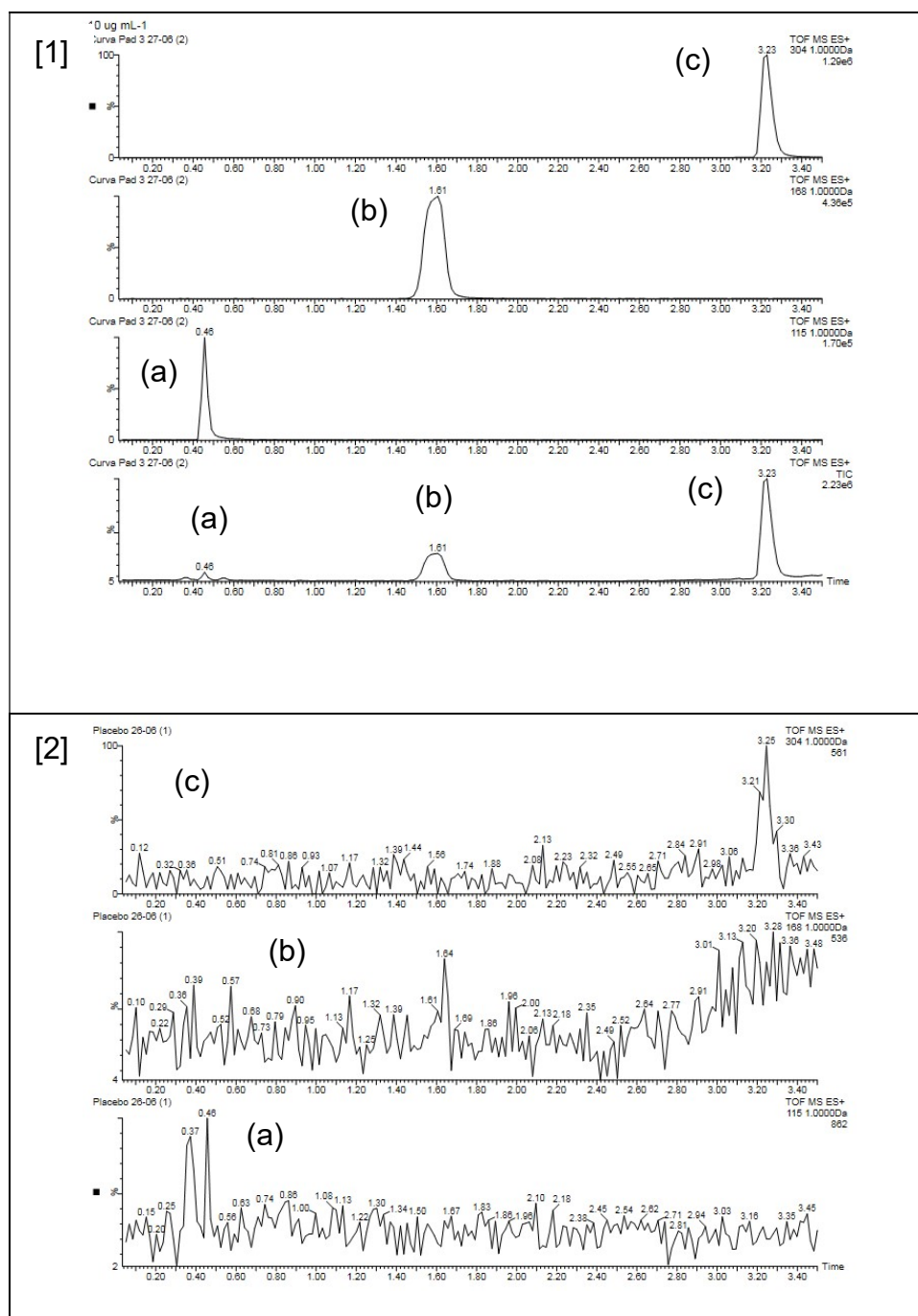


Figure 5. [1] Mass chromatogram of a standard preparation of impurity 1 (a), impurity 2 (b) and VLG (c) of extracted ion and chromatogram of impurity 1 (a), impurity 2 (b) and VLG (c) with simulated excipient mixture; [2] Chromatogram of simulated excipient mixture with selection of exact ion of impurity 1 (a), impurity 2 (b) and VLG (c).

The use of UPLC allows the increase speed of analysis without a decrease in chromatographic performance and less solvent consumption, better resolution properties and faster chromatography enhance the quality of the data also with productivity (10).

In this case, the separation of the compounds with specificity allows the identification of impurities and quantification that ensure quality control of the drug.

The choice of an analytical methodology for detect impurities should be as lower as possible and it is so important because the limits allowed according to international guides are very small.

In this case, the determined LOD and LOQ values for VLG and its two impurities are reported at Table 1, they are low and in agreement with the official guides. By this, the limit of impurities for VLG are 25 µg for reporting threshold, 50 µg for identification and 75 µg for qualification threshold (25).

Table 1. Limits of detection and quantification of VLG, impurities 1 and 2. Linearity of VLG, impurity 1 and impurity 2.

Limit of detection ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Limit of quantification ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
VLG	Impurity 1	Impurity 2	VLG	Impurity 1	Impurity 2
0.015	0.1	0.05	0.03	0.5	0.2
Linearity					
	Slope	Intercept	R^2		
VLG	2767.60	12033.00	0.998		
Impurity 1	458.69	823.53	0.998		
Impurity 2	3530.00	5016.60	0.997		

The linearity standard plot for the assay method was performed over the calibration ranges tested, that is, 5.0 – 40.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for VLG, 1.0 – 20.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for impurity 1 and 2. All the determination coefficients obtained were greater than 0.99 (Table 1). The result shows that an excellent correlation existed between the peak areas and concentration of the analytes confirming linearity. Additionally, ANOVA showed a non-significant linearity deviation ($p>0.05$).

EL-BAGARY and co-workers used concentrations of 5.0 to 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for VLG just in presence of the impurity 3-amino-1-adamantanol (impurity 2) without the linearity of this compound (6), BARDEN and collaborators used the concentrations in the range of 20.0 – 80.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for VLG (8).

The new methodology developed in this research used smaller concentrations with satisfactory results and suitable for the proposed objective.

The mean (%) and RSD (%) of the assay results obtained in the repeatability and intermediate precision study are reported in Table 2. These results confirmed that the method is highly precise with slow variations and the RSD was less than 5.0%. The results obtained show that they are in agreement with researchers who analyzed VLG using different analytical methods (6; 7; 8).

Table 2 – Data of intraday, interday precision and accuracy.

Intraday (n = 6)			
	VLG (%)	Impurity 1 (%)	Impurity 2 (%)
Mean	100.54	101.80	99.33
RSD	1.21	2.09	2.64
Interday (n = 18)			
	VLG (%)	Impurity 1 (%)	Impurity 2 (%)
Mean	97.62	102.21	100.23
RSD	4.38	4.86	3.99
Accuracy			
	Taken ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)
VLG	15	14.1	94.0
	20	20.2	101.0
	25	25.0	100.2
Impurity 1	10	11.1	111.0
	15	16.0	106.5
	20	19.1	95.5
Impurity 2	10	10.9	108.9
	15	16.2	108.0
	20	19.8	98.9

Recovery of VLG ranged from 94% to 101%, of impurities 1 and 2 ranged from 95.0% to 111.0% (Table 2). In UV detection, the reproducibility of the area is greater than MS detector and by this, the acceptable limit is 15%.

The results obtained by other researches were similar to this research and although the acceptable limit for recovery of impurities can be higher because the use of small concentration of this substances and the detector used (MS), the results obtained in this research were similar (6; 7; 8).

The use of MS/MS for identification and quantification is a selectivity and sensitivity tool compared to UV-DAD detector which does not difference compounds what has similar chromophore groups and for substances that can not been identified by this mode.

Along with that, the detection and characterization of impurities has received important attention by the pharmaceutical industries and international guides. In this case, UPLC-MS/MS correspond to an important hyphenated techniques with fast and reliable analysis with determination of fragmentation mechanisms and elucidation of structures highly sensitive.

4. Conclusion

The control of quality and safety for new developed drugs is a challenge for researchers and there are few studies about impurities of drugs. The present study was able to detect and quantify the main VLG synthesis impurities at low levels and it is very important when analyzing small amounts of new drug substances.

An gradient UPLC method was successfully developed for quantitative analysis of VLG and its main impurities 1 and 2 with precision, accuracy, linearity, robustness and specificity. The analytical method proved to be suitable for the purpose and exhibited an excellent performance in terms of sensitivity and speed.

The analysis performed by full factorial design allowed the evaluation of modifications in flow rate, injection volume and temperature showing that the interations between them do not compromisses the quantification. The method can be used for analysis of production samples and to check the quality of samples of VLG.

5. References

1. HENNESS, S. KEAM, S. J. Vildagliptin. *Drugs*, v. 66, p. 1989-2001, 2006.
2. ROY, J. Pharmaceutical impurities – a mini review. *AAPS PharmSciTech*, v. 3, p. 1-8, 2002.
3. VILLHAUER, E.B. BRINKMAN, J.A. NADERI, G.B. BURKEY, B.F. DUNNING, B.E. PRASAD, K. MANGOLD, B.L. RUSSELL, M.E. HUGHES, T.E. 1-[[[(3-Hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: A potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *J. Med. Chem.*, v. 46, p. 2774-2789, 2003.
4. JAIN, D., BASNIWAL, P.K. Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 11-35, 2013.
5. KUMAR, N. DEVINENI, S.R. SINGH, G. KADIRAPPA, A. DUBEY, S.K. KUMAR, P. Identification, isolation and characterization of potential process-related impurity and its degradation product in vildagliptin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 119, p. 114-121, 2016.
6. EL-BAGARY, R. ELKADY, E.F. AYOUB, B.M. Liquid chromatographic methods for the determination of vildagliptin in the presence of its synthetic intermediate and the simultaneous determination of pioglitazone hydrochloride and metformin hydrochloride. *Int. J. Biomed. Sci.*, v. 7, p. 201-208, 2011.
7. EL-BAGARY, AZZAZY, H.M.E. EL-KADY, E.F. FAROUK F. Simultaneous determination of metformin, vildagliptin and 3-amino-1-adamantanol in human plasma: application to pharmacokinetic studies. *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 39, p. 195-202, 2016.
8. BARDEN, A.T. BARBARA, S. SCHAPOVAL, E.E.S. STEPPE, M. Stability-indicating RP-LC method for the determination of vildagliptin and mass spectrometry detection for a main degradation product. *Journal of Chromatographic Science*, v. 50, p. 426-432, 2012.
9. HOLM, R. ELDER, D.P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 118-135, 2016.
10. GUMUSTAS, M. KURBANOGLU, S. USLU, B., OZKAN, S.A. UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, v. 76, p. 1365-1427, 2013.
11. SWARTZ, M.E. UPLC: An introduction and review. *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 28, p. 1253-1263, 2005.
12. TALEUZZAMAN, M. ALI, S. GILANI, S.J. IMAM S.S HAFEEZ, A. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, v. 2, p. 1-5, 2015.

13. FAYED, A.S. HEGAZY, M.A.M. WAHAB, N.S.A. Chromatographic analysis of a multicomponent mixture of B1, B6, B12, benfotiamine, and diclofenac; part I: HPLC and UPLC methods for the simultaneous quantification of these Five components in tablets and capsules. *Drug formulation and clinical methods*, v. 99, p. 1513- 1521, 2016.
14. HEYDEN, Y.V. NIJHUIS, A. SMEYERS-VERBEKE, J. VANDEGINSTE, B.G.M. MASSART, D.L. Guidance for robustness: ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 21, p. 723-753, 2001.
15. RAKIC, T. KASAGIC-VUJANOVIC, I. JOVANOVIC, M. JANCIC-STOJANOVIC, B. IVANOVIC, D. Comparison of full factorial design, central composite design, and Box-behnken design in chromatographic method development for the determination of fluconazol and its impurities. *Analytical Letters*, v. 47, p. 1334-1347, 2014.
16. HIBBERT, D.B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. *Journal of Chromatography B*, v. 910, 2-13, 2012.
17. ROZET, E. LEBRUN, P. DEBRUS, B. BOULANGER, B. HUBERT, P. Design space for analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 42, p. 157- 167, 2013.
18. FERREIRA, S.L.C. CAIRES, A.O. BORGES, T.S. LIMA, A.M.D.S. SILVA, L.O.B. SANTOS, W.N.L. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchemical Journal*, v. 131, p. 163-169, 2017.
19. ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
20. USP 40 – USP Pharmacopeial. 40 ed, United States, 2017.
21. MODDE Pro 11 statistical software. Umetrics MKS AB, version 11.
22. BARWICH, V.J. Sources of uncertainty in gás chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 849, p. 13-33, 1999.
23. KOTRIKLA, A. LEKKAS, T.D. The HPLC separation of two mixtures of neutral pesticides: effects of temperature, gradient steepness, and flow rate. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 24, p. 543-553, 2001.
24. MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 5th ed. John Wiley & Sons, 2001.
25. ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Impurities in New Drug Products Q3B(R2), 2006.

7. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

7. CAPÍTULO IV: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

7.1. INTRODUÇÃO

As impurezas de fármacos, quando presentes, devem estar na menor quantidade possível. Desta forma, a avaliação toxicológica é importante para garantir a segurança do produto final (PAIM et al., 2013).

Os ensaios realizados neste trabalho seguem as diretrizes da *Organization for Economic co-Operation and Development* (OECD), que apresenta metodologias alternativas para a avaliação da toxicidade aguda *in vitro* (OECD, 2010).

Dentre os testes utilizados para avaliar a toxicidade, tem-se o ensaio de MTT que quantifica a atividade mitocondrial pela formação do formazan a partir da redução do anel tetrazólico avaliando a viabilidade celular (LOBNER, 2000).

Outro ensaio correspondente é a técnica do vermelho neutro, que identifica as células viáveis após exposição da substância testada (WEYERMANN et al., 2005). Este ensaio é um indicador altamente sensível, podendo ser utilizado para medir a replicação celular, os efeitos citostáticos ou a morte celular (REPETTO et al., 2008).

O ensaio do óxido nítrico também contribui na avaliação toxicológica, visto que este é formado endogenamente e apresenta importante papel em doenças inflamatórias. Adicionalmente, a presença do oxigênio molecular pode reagir de modo a formar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, comprometendo o DNA, inibindo várias enzimas e iniciando a peroxidação lipídica (GRISHAM et al., 1999).

Da mesma forma, no estresse oxidativo caracterizado por alterações nos sistemas pró-oxidante/antioxidante, prevalece o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio também podem ser avaliados, como um mecanismo de toxicidade (COSTA et al., 2013). A citotoxicidade proveniente dos danos oxidativos comprometem para a abertura de poros, perda do potencial de membrana e permeabilidade mitocondrial contribuindo para a morte celular (PEREIRA et al., 2012).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial também é importante, visto que esta organela exerce controle sobre o acúmulo de Ca^{2+} intracelular, a respiração e também a síntese de ATP, de modo a garantir o adequado funcionamento da célula (WARD et al., 2007).

Assim como a avaliação da citotoxicidade é necessária, os testes que avaliam a genotoxicidade dos compostos contribuem nas análises visto que as impurezas genotóxicas induzem mutações, quebras de cromossomos e ou rearranjos apresentando potencial para causar câncer (RAMAN et al., 2011).

O guia do ICH fornece orientações sobre estas substâncias. Caso tenha sido identificado um risco potencial, é necessário um rigoroso controle durante o processo e também o desenvolvimento de metodologias analíticas para garantir os níveis aceitáveis (ICH M7, 2014).

Até o momento, a literatura pesquisada não apresentou estudos de toxicidade para as impurezas de síntese da sitagliptina e também da vildagliptina.

Para tanto, foram realizados os ensaios do MTT, vermelho neutro, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, avaliação do óxido nítrico, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e ensaio cometa nas impurezas 1, 2, 3, 4 e nos fármacos sitagliptina e vildagliptina.

Os respectivos testes foram realizados em parceria com o laboratório de toxicologia (LATOX) coordenado pela professora Solange Cristina Garcia na UFRGS.

**7.2. ARTIGO CIENTÍFICO III: TOXIC EVALUATION OF TWO GLIPTINS AND ITS
MAIN DRUG IMPURITIES OF SYNTHESIS**

Artigo a ser submetido ao periódico Drug and Chemical Toxicology

7.2. IN VITRO TOXIC EVALUATION OF TWO GLIPTINS AND ITS MAIN DRUG IMPURITIES OF SYNTHESIS

Abstract

The presence of impurities in drugs may compromise the safety and efficacy of drug therapy and this qualification allow the evaluation data in order to establish the biological safety. Therefore, the aim of this study was to assess the toxic potential of sitagliptin, vildagliptin and their impurities in mouse fibroblast 3T3 cells and the underlying mechanism of its cellular toxicity. Cytotoxicity was observed in MTT assay only for the impurity 4 of vildagliptin at 500 and 1000 μM . In neutral red uptake assay, impurity 4 of vildagliptin was cytotoxic at 1000 μM . ROS and RNS generation was found at 1000 μM of sitagliptin and 10 μM of both vildagliptin impurities. DNA damage, as measured by comet assay was not observed at the tested concentrations. NO evaluation was found at 10 μM only for impurity 3 of vildagliptin and impurities 1 and 2 did not present cytotoxicity.

Keywords: Sitagliptin phosphate, vildagliptin, drug impurities, cytotoxicity, genotoxicity

1. INTRODUCTION

Toxicity of drugs is one of main challenges for pharmaceutical industry and it also contributes for failures in late-stage, increased cost and market withdrawals (SEGALL and BARBER, 2014). Nowadays, besides the toxicity of compounds present in drug formulations, attention has been driven to the presence of impurities (BERNARDI et al., 2015; CODEVILLA et al., 2013; COSTA et al., 2014; EMERCE et al., 2015; PAIM et al., 2013).

Impurities in pharmaceutical products correspond to undesirable chemicals that remain in active ingredients or developed during formulation and also through aging (ROY, 2002; NAGPAL et al, 2011).The presence of impurities is a significant problem in the synthesis of new compounds, since this process occurs from starting materials, solvents, intermediates and by-products (AHUJA, 2007).

Pharmacological and toxicological profile is responsible for safety of a drug and for its adverse effects that can also be caused by the presence of impurities present in pharmaceutical products. Therefore, it is necessary to monitor and control impurities to ensure quality and safety of a drug (JAIN and BASNIWAL, 2013).

Regulatory units are attentive to this issue and have been searching different strategies to ensure the quality and safety of pharmaceutical preparations (ICH-Q3A (R2), 2006; ICH-Q3B (R2) 2006).According to ICH-Q3A (R2), there is reporting, identification and qualification thresholds. The least corresponds to data acquisition and evaluation process that determines biological safety for one impurity or a certain profile of impurities at the level being considered safe (BASAK et al., 2007).

The thresholds for qualification of impurities are appropriate based in individual drugs and it is important when exist evidence that some impurities in drugs or therapeutic classes were related with adverse reactions in patients (ICH-Q3A (R2), 2006).

Toxicity tests are used to evaluate the potential of a chemical in causing harmful effects in experimental systems. The research can be realized on the drug product or substance containing impurities or isolated impurities can be analyzed (BASAK et al., 2007). Among these deleterious effects, there is the possibility of impurities to induce genetic mutations, breaks and/ or chromosomal rearrangements presenting the potential to promote neoplastic alterations (ROBINSON, 2010; RAMAN et al., 2011).The European Medicines Agency (EMA) published a guide in

2006 recommending that any genotoxic impurity should be identified concerning its genotoxicity or whether its chemical structure is an alert for toxicity. It was also adopted the concept of threshold of toxicological concern in which it establishes the safe dose for all potential carcinogens, which corresponds to 15 µg per day (ROBINSON, 2010; RAMAN et al., 2011; DOW et al., 2013). The ICH M7 official guide determines the levels of impurities that are not carcinogenic and presents tests that evaluate the mutagenic control present in active substance or final product in order to ensure the safety and quality for the users (ICH M7, 2014).

At this moment, there are no studies reported in the literature about this impurities toxicity. The aim of this work was to study the toxicity of the drugs sitagliptin and vildagliptin and its main impurities of synthesis using mouse fibroblast 3T3 cell line as in vitro model. Cytotoxicity was evaluated through the MTT reduction and neutral red (NR) uptake assays. Besides, some mechanisms such as oxidative stress (reactive oxygen and nitrogen species production), inflammation (nitric oxide), mitochondrial function, and genotoxicity were also evaluated.

1. MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Sitagliptin phosphate reference standard (99.5%), vildagliptin reference standard (99.5%) and 3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-[1,2,4] triazolo [4,3-a] pyrazine-HCl (99,3%) (impurity 1) were supplied by Sequoia Research Products (Oxford, UK). O- benzylhydroxylamine hydrochloride (99.0%) (impurity 2), 2-pyrrolidinecarboxamide (98.0%) (impurity 3) and 3-amino-1-adamantanol (96.0%) (impurity 4) were supplied by Sigma-Aldrich (Brazil).

All chemicals were used as supplied. Stock solutions of sitagliptin, vildagliptin, impurities 1, 2, 3 and 4 were made in purified water obtained by Millipore®. All stock solutions were stored at -20 °C and freshly diluted on the day of the experiment.

2.2 Cell culture

The 3T3 cell line was routinely cultured in 75 cm² flasks using DMEM supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U mL⁻¹ of penicillin and 100 mg mL⁻¹ of streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂-95% air atmosphere. The cells were fed every 2-3 days, and sub-cultured once 70-80% confluence was reached.

2.3 Cytotoxicity assays

The cytotoxicity was evaluated through the MTT reduction and NR uptake assays. Cells were seeded at a density of 3000 cells per well in 96 well plates. Triton X-100 1% was used as a positive control. Concentration-response curves were obtained incubating the cells with 0.5 10– 50– 100– 500 and 1000.0 μM for 24 h at 37 °C.

2.4 MTT reduction assay

MTT reduction assay was performed as previously described (ARBO et. al., 2014). After a 24 hours incubation of the cells with drugs and impurities, the medium was removed and replaced by fresh medium containing 0.5 mg mL⁻¹ MTT. The cells were incubated at 37 °C for 2 h. After, the cell culture medium was removed and the formed formazan crystals were dissolved in DMSO. The absorbance was measured at 550 nm in a multi-well plate reader (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Results were graphically presented as percentage of cell death vs concentration (μM). All drugs and impurities were tested in three independent experiments with each concentration tested in three replicates within each experiment.

2.5 Neutral red uptake assay

The assay was performed according to the OECD document 129 (OECD, 2010) and as previously described by ARBO et. al., 2014. At the end of the 24 h incubation-time of the cells with drugs and impurities, the medium was replaced by

new medium containing $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ NR and incubated at 37°C for 3 h. After that, the cells were lysed with a 50% ethanol: 1% glacial acetic solution (v/v). The absorbance was measured at 540 nm in a multi-well plate reader. The percentage of cell death relative to the control cells was used as the cytotoxicity measure. All drugs were tested in three independent experiments with each concentration tested in three replicates within each experiment.

2.6 Measurement of intracellular reactive oxygen and nitrogen species

The intracellular reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species production was monitored by means of the DCFH-DA assay as previously described (ARBO et. al., 2014). For this determination, cells were seeded at a density of 3000 cells per well in 96 well plates and allowed to grow for 24 h. On the day of the experiment, the cells were pre-incubated with 10 mM DCFH-DA for 30 minutes at 37°C in the dark. The cells were rinsed with PBS and incubated with drugs and impurities at 10, 100, and 1000 μM for 24 h. Fluorescence was recorded on a fluorescence microplate reader (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) set at 485 nm excitation and 530 nm emission. The data obtained were calculated as the percentage of control conditions for each experiment from at least three independent experiments with each concentration tested in three replicates within each experiment.

2.7 Measurement of nitric oxide

Cells were seeded at a density 50,000 cells per well in 96 well plates and allowed to grow for 24 h. Drugs and impurities were incubated at 10, 100, and 1000 μM for 24h at 37°C . After the incubation time, 100 μL of supernatant was transferred to another plate and 100 μL Griess reagent was added and the plate was incubated at 37°C . After 20 minutes incubation-time, the absorbance was measured at 540 nm in a multi-well plate reader (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The data obtained were calculated as the percentage of control conditions for each experiment from at least three independent experiments with each concentration tested in three replicates within each experiment.

2.8 Assessment of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Evaluation of mitochondrial integrity was performed by measuring tetramethyl rhodamine ethyl ester (TMRE) inclusion as previously described (ARBO et al., 2014). After 24 h of incubation at 37 °C, the medium was gently aspirated and the cells were incubated with drugs and impurities at 10, 100, and 1000 μ M for 24 h. Medium was substituted by 2 mM TMRE for 30 minutes at 37 °C in the dark. Afterwards, the medium was gently aspirated and replaced by 0.2% BSA in HBSS. Fluorescence was measured on a fluorescence microplate reader set to 544 nm excitation and 590 nm emission. The data obtained were calculated as the percentage of control conditions for each experiment from at least three independent experiments with each concentration tested in three replicates within each experiment.

2.9 Comet assay

Cells were seeded in 12-well plates (Nest Biotech Co., Ltd, China) at a density of 200,000 cells per well. After 24 hours, the medium was aspirated and cells were incubated with drugs and impurities at 10, 100, and 1000 μ M at 37 °C. After 24h incubation-time, cells were harvested by trypsinization (0.05% trypsin/EDTA), centrifuged (400xg, 5 min, 4°C). Cell pellets were resuspended in low-melting point agarose (0.75%, 150 μ L) and 60 μ L aliquots were distributed on two slides coated with 1% normal-melting agarose. Samples were incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, distilled water, 10% DMSO and 1% Triton X-100) at 4 °C for 24 hours in the dark. Slides were then incubated with alkaline electrophoresis running buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min at 4 °C before electrophoresis, carried out for 20 min at 25 V and 300 mA. After that, the slides were neutralized with 0.4 M Tris-HCL for 15 min at dark. DNA was fixed by immersing the slides in 70% ethanol for 15 min and in absolute ethanol for further 15 min and let it dry overnight. For microscopy analysis, the dried slides were stained with gel red (20 μ g/mL) and DNA migration was observed in at least 100 cells at 400x magnification using a fluorescence microscope (Olympus, Japan) equipped with an excitation filter of 510-550 nm connected to a camera. Images were evaluated by Comet ScoreTM software, obtained from the public domain (http://www.tritekcorp.com/products_cometscore.php). The percentage of DNA in the

comet tail (% DNA in tail) was the DNA damage parameter evaluated to describe comet formation (DOKTOROVOVA et al., 2014). Concurrently with the comet assay, an extra and identical replicate comet slide was prepared, lysed, and immediately fixed and stained without electrophoresis for evaluation of the cytotoxicity through the low molecular weight (LMW) DNA diffusion assay (VASQUEZ, 2010).

2.10 Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments. Normality of the data distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Significance was accepted at $p < 0.05$. Statistical comparisons between groups were performed by one-way ANOVA (when followed normal distribution) or with the Kruskal-Wallis test (in case data distribution was not normal). Details of the statistical analysis are provided in the text and legend of the figures.

2. RESULTS

Cytotoxicity analysis was carried out by incubating the 3T3 cells with 0–1 μ M of sitagliptin, vildagliptin and their impurities for 24 h. The results obtained in the MTT reduction assay are presented in Figure 1. Based on the data, only impurity 4 presented a significant ($p < 0.001$, ANOVA/Bonferroni) reduction on cell viability at 500 and 1000 μ M.

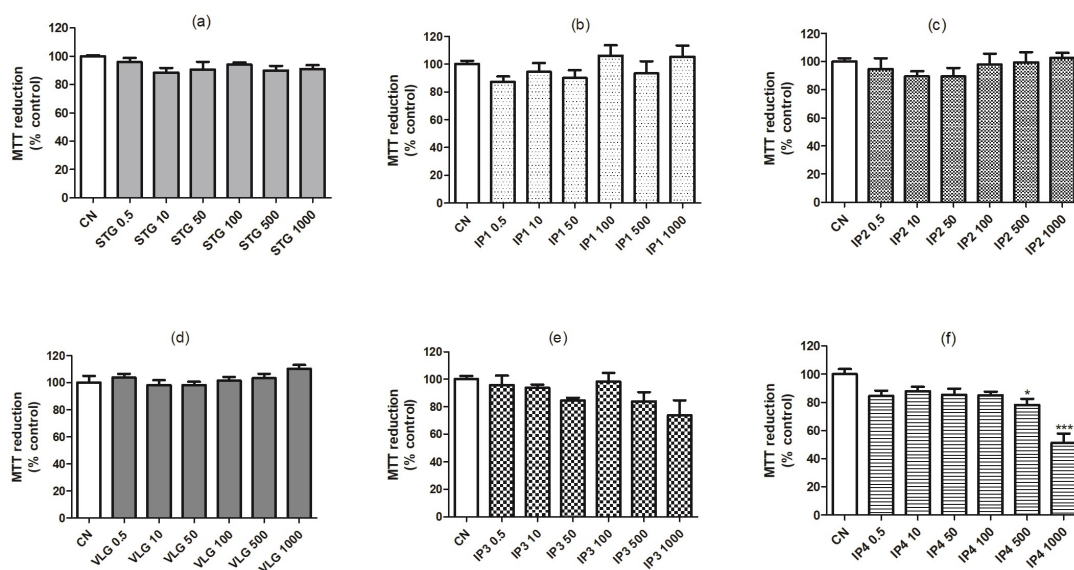


Figure 1. Cell viability evaluated by the MTT reduction assays in 3T3 cells; sitagliptin - STG (a), impurity 1 – IP1 (b), impurity 2 – IP2 (c), vildagliptin - VLG (d), impurity 3 – IP3 (e), impurity 4 – IP 4 (f). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ versus control).

Interestingly, in the neutral red up-take assay (Figure 2), sitagliptin presented a significant ($p < 0.001$, ANOVA/Bonferroni) cytotoxicity at concentrations of 500 and 1000 μM . Besides, impurity 4 also showed significant ($p < 0.01$, ANOVA/Bonferroni) toxicity at the highest concentration (1000 μM), corroborating the results obtained with MTT reduction assay.

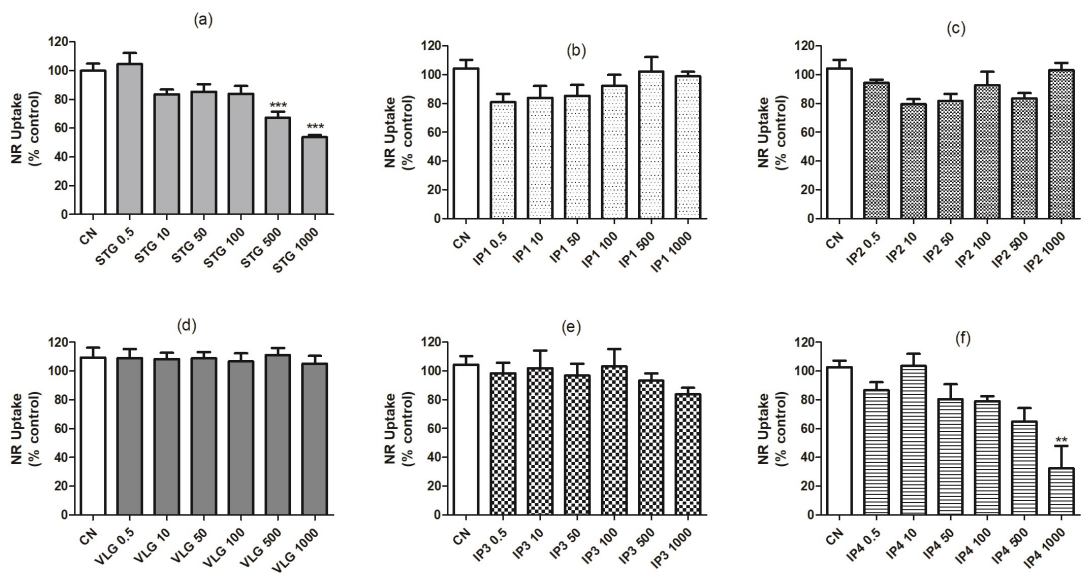


Figure 2. Cell viability evaluated by the neutral red uptake in 3T3 cells; sitagliptin - STG (a), impurity 1 – IP1 (b), impurity 2 – IP2 (c), vildagliptin - VLG (a), impurity 3 – IP3 (b), impurity 4 – IP 4 (c). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control).

Figure 3 shows the results of the ROS and RNS production. A significant ($p < 0.01$, ANOVA/Bonferroni) increase in reactive species was observed at 1000 μM sitagliptin, and at 10 μM impurities 3 and 4.

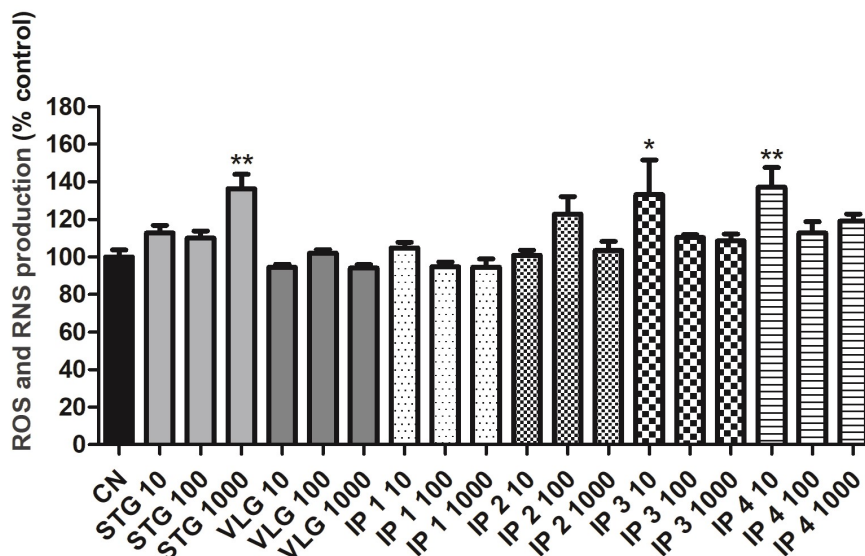


Figure 3. Results of the evaluation of reactive oxygen and nitrogen species in 3T3 cells after incubation with DCFH-DA. Sitagliptin - STG, impurity 1 – IP1, impurity 2 – IP2, vildagliptin - VLG, impurity 3 – IP3, impurity 4 – IP 4. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control).

As depicted in figure 4, impurity 3 at 10 μ M presented a significant decrease in NO levels after 24 hours incubation.

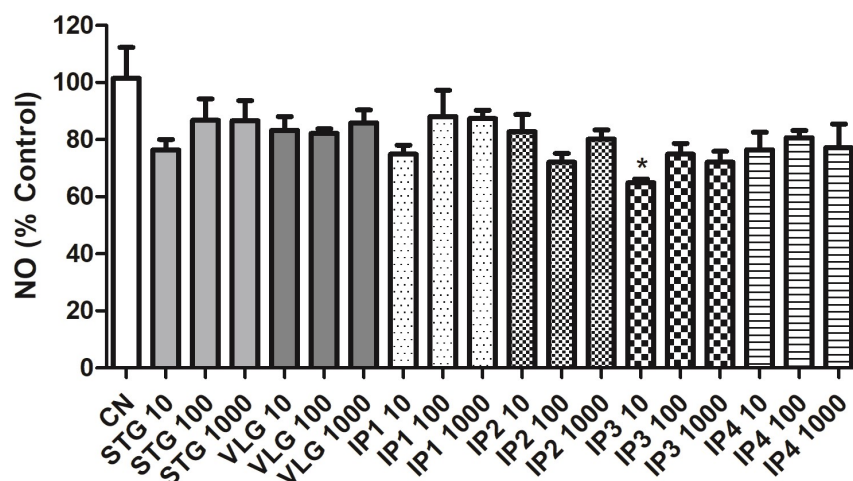


Figure 4. Evaluation of nitric oxide levels in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities. Sitagliptin - STG, impurity 1 – IP1, impurity 2 – IP2, vildagliptin - VLG, impurity 3 – IP3, impurity 4 – IP 4. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control).

The evaluation of $\Delta\psi_m$ contributes with important information about the mitochondrial function and also about the physiological state of the cell (SILVA et al., 2014). As shown in Figure 5, any significant alterations were found in $\Delta\psi_m$ after 24h incubations of 3T3 cells with drugs or impurities.

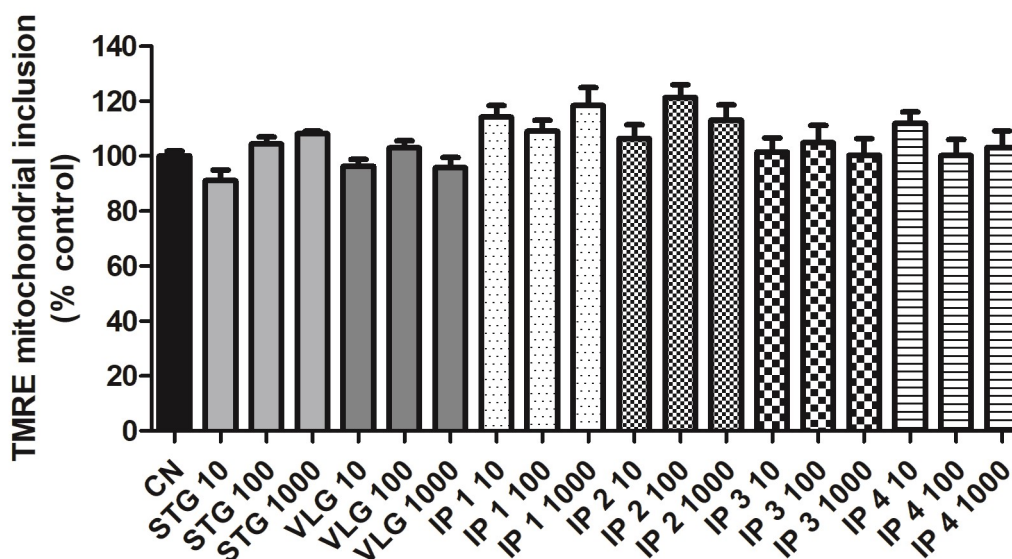


Figure 5. Evaluation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities. Sitagliptin - STG, impurity 1 – IP1, impurity 2 – IP2, vildagliptin - VLG, impurity 3 – IP3, impurity 4 – IP 4. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni.

The comet assay corresponds to the capacity of negatively charged fragments of DNA to be extracted through an agarose gel in response to an electric field. It is a rapid, sensitive and simple method for detecting DNA damage (KUMARAVEL et al., 2009). The results obtained by alkaline comet assay indicate that neither drugs or impurities elicited DNA breaks at the tested concentrations (figure 6). The results of LMW DNA diffusion assay indicated that, under our experimental conditions, drugs and impurities did not induce a significant cell death (figure 7).

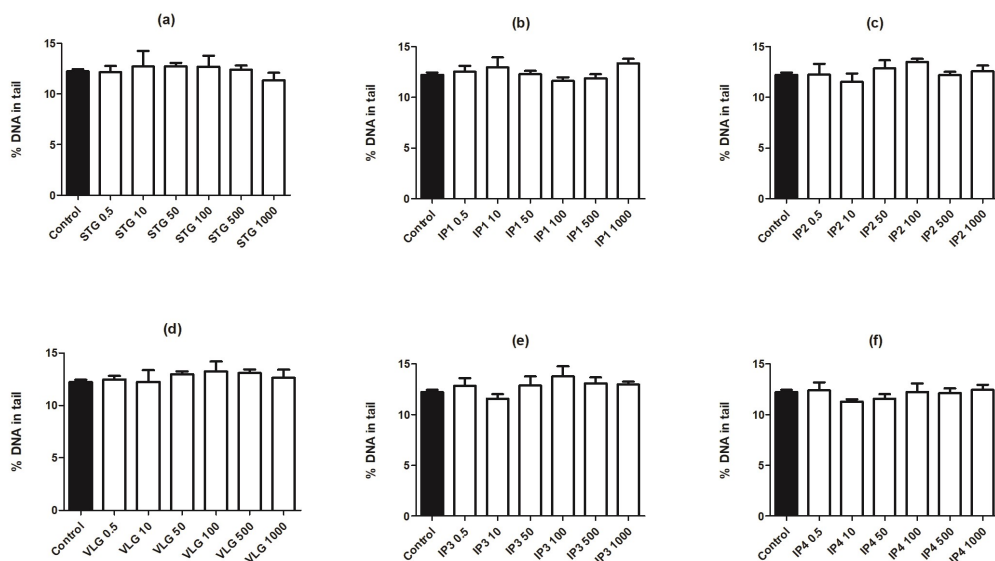


Figure 6. DNA damage in alkaline comet assay in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities. Sitagliptin - STG, impurity 1 – IP1, impurity 2 – IP2, vildagliptin - VLG, impurity 3 – IP3, impurity 4 – IP 4. Results expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni.

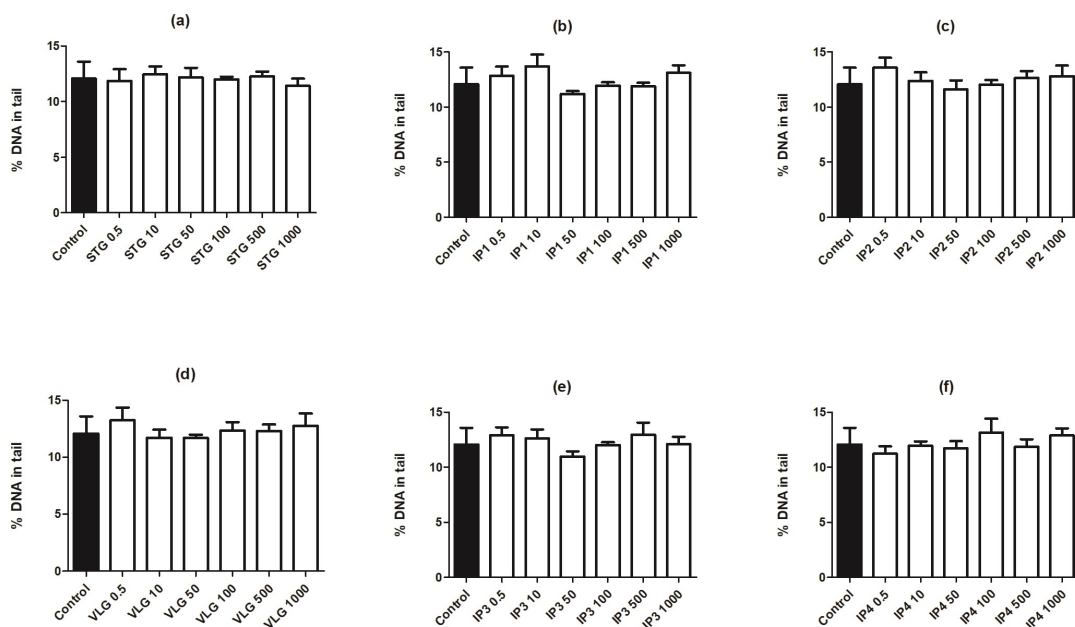


Figure 7. DNA damage in LMW DNA diffusion assay in 3T3 cells 24 hours after incubation with drugs and impurities. Sitagliptin - STG, impurity 1 – IP1, impurity 2 – IP2, vildagliptin - VLG, impurity 3 – IP3, impurity 4 – IP 4. Results expressed as

mean \pm standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni.

3. DISCUSSION

Sitagliptin and vildagliptin are gliptins used for the treatment of diabetes mellitus, they are well tolerated, with a low risk of hypoglycemia, they do not cause weight gain, and the administration can be once a day (CHAHAL AND CHOWDHURY, 2007). The safety of pharmaceutical products should be considered, especially in chronic use where a daily accumulation of the impurity may compromise the patient's health. The official guides recognize the importance of controlling drug impurities in order to attend the human exposure to potential toxic impurities, therefore it is important to perform toxicity tests.

As far as we know, this is the first study investigating the toxicity of sitagliptin and vildagliptin, and their main impurities of synthesis. In this work, the cytotoxicity was analysed through the MTT reduction assay, which evaluates the reduction of MTT tetrazolium salt (soluble in water) to formazan MTT (water insoluble) by cellular dehydrogenases within the metabolically active cells. This reduction occurs when mitochondrial enzymes are active; correlating with the number of viable cells (LOBNER, 2000). Moreover, the neutral red uptake assay, which is based on the ability of the lysosomes of viable cells to incorporate the dye (REPETTO et al., 2008), was also applied. Interestingly, results obtained by both tests generated slight variations, probably due to the use of different methods. Cadmium chloride (CdCl_2) cytotoxicity was evaluated in HepG2 cells by MTT reduction, neutral red uptake, protein quantification, and LDH activity assays, in which MTT reduction demonstrated to be more sensitive (FOTAKIS and TIMBRELL, 2006). In contrast, in our research, neutral red uptake assay was more sensitive compared to the MTT for sitagliptin. Among the impurities, impurity 4 of vildagliptin showed toxicity by both MTT and neutral red assays.

Production of reactive species (ROS and RNS) was measured using DCFH-DA fluorescent probe. This compound crosses cell membranes and it is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases in dichlorodihydrofluorescein, non-fluorescent (DCFH). In the presence of reactive species, this is oxidized to form a fluorescent compound (DCF) (LEBEL et al., 1992). At high concentrations, ROS

and RNS can cause damage to lipids, proteins, and DNA, compromising the function of enzymes or transporters (COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2014). Our results indicated an increase in the ROS and RNS production at 1000 μM sitagliptin, suggesting that oxidative stress plays an important role in the cytotoxicity observed for sitagliptin in the same concentration. Increased reactive species were also observed for 10 μM impurities 3 and 4. Considering that any cytotoxicity was observed at the same concentration level, it could be supposed that compensatory mechanisms could be activated to counteract the free radicals at higher concentration levels.

In addition, reactive species also mediate the endogenous formation of NO, which is related to chronic inflammatory diseases, playing an important role in the pathophysiology of different inflammation models (GRISHAM et al., 1999). The overproduction of NO from NO synthase and the activation of this enzyme by macrophages contribute to inflammation, cancer and autoimmune disorders (LEE et al., 2014). The results obtained for NO production indicated that drugs and impurities do not elicit an inflammatory response in the cells. Interestingly, impurity 3 at 10 μM seems to suppress NO levels, which also serves as a second messenger in some pathways.

In cells, mitochondria play an important role in the normal function and it is a regulator during the transition in cell death by both necrosis and apoptosis (GRIFFITHS, 2000). The $\Delta\psi\text{m}$ is responsible for controlling the accumulation of Ca^{2+} in the mitochondrial matrix, respiration and also the synthesis of ATP (WARD et al., 2007). Because it is crucial to maintain the physiological function of the respiratory chain that generates ATP, changes in $\Delta\psi\text{m}$ compromise oxidative phosphorylation by reducing cell energy inducing cell death (Silva et al., 2014). Our results indicated that neither drugs or impurities seems to interfere with the mitochondrial function.

In the comet assay, the shape, size and amount of DNA in comets are important for the test and correlate with the extent of DNA damage (KUMARAVEL et al., 2009). Our results indicated that neither drugs or impurities induced DNA breaks due to genotoxicity (direct DNA damage) or cytotoxicity (DNA damage due to necrosis or apoptosis).

4. CONCLUSION

It was described, for the first time, the cytotoxicity of sitagliptin, vildagliptin and their chemical synthesis impurities in an in mouse fibroblast 3T3 cells. Sitagliptin presented cytotoxicity at 500 and 1000 μM and formation of ROS and RNS at 1000 μM . Moreover, except for impurity 4, the other impurities did not elicited significant cytotoxicity. This study provides important information to ensure the safety and quality of new drugs developed and also those already available in the market.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to CAPES and CNPq (Brazil) for financial support.

REFERENCES

AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, p. 3-11, 2007.

ARBO, M. D. SILVA, R. BARBOSA, D.J. SILVA, D.D. ROSSATO, L.G. BASTOS, M.L. CARMO, H. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardionyoblast h9c2 cells through mitichondrial impairment. *Toxicology Letters*, v. 229, p. 178-189, 2014.

BASAKA, A.K. RAW, A.S. AL HAKIM, A.H. FURNESS, S. SAMAAAN, N.I. GILL, D.S. PATEL, H.B. POWERS, R.F. YU, L. Pharmaceutical impurities: regulatory perspective for abbreviated new drug applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 64-72, 2007.

BERNARDI, R.M. D'AVILA, F.B. TODESCHINI, V. ANDRADE, J.M.M. FRÖEHLICH, P. BERGOLD, A.M. Main degradation products of dabigatran etexilate evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and in vitro cytotoxicity studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, p. 660-666, 2015.

CHAHAL, H. CHOWDHURY, .T.A. Gliptins: a new class of oral hypoglycaemic agent. *The Quarterly Journal of Medicine*, v. 100, p. 671-677, 2007.

CODEVILLA, C.F. LANGE, A.D.C. ANDRADE, J.M.M. SEGALIN, J. FROEHLICH, P.E. BERGOLD, A.M. Photodegradation kinetics of Iodenafil carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and in vitro cytotoxicity. *Analytical Methods*, v. 5, p. 6511-6516, 2013.

COSTA, M.C.N. BARDEN, A.T. ANDRADE, J.M.M. OPPE, T.P. SCHAPOVAL, E.E.S. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. *Talanta*, v. 119, p. 367-374, 2014.

DOKTOROVOVA, S. SILVA, A.M. GAIVÃO, I. SOUTO, E.B. TEIXEIRA, J.P. MARTINS-LOPES, P. Comet assay reveals no genotoxicity risk of cationic solid lipid nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, p. 395-403, 2014.

DOW, K.L. HANSEN, M.M. PACK, B.W. PAGE, T.J. BAERTSCHI, S.W. The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.12, p.1404-1417, 2013.

EMERCE, E. COK, I. DEGIM, T. Determination of the impurities in drug products containing montelukast and in silico/in vitro genotoxicological assessments of sulfoxide impurity. *Toxicology Letters*, v. 238, p. 90-99, 2015.

FOTAKIS, G. TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006.

GRIFFITHS, E.J. Mitochondria- potential role in cell life and death. *Cardiovascular Research*, v. 46, p. 24-27, 2000.

GRISHAM, M.B. JOURD'HEUIL, D. WINK, D.A. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology*, v. 276, p. G315-G321, 1999.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Impurities in New Drug Substances Q3A(R2), 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Impurities in New Drug Products Q3B(R2), 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7, 2014.

JAIN, D., BASNIWAL, P.K. Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 11-35, 2013.

KUMARAVEL, T.S. VILHAR, B. FAUX, S.P. JHA, A. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, v. 25, p. 53-64, 2009.

LEBEL, C.P. ISCHIROPOULOS, H. BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2,7-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v.5, p. 227-231, 1992.

LEE, M. KERNS, E. LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 18, p. 187-279, 1999.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, v. 96, p. 147-152, 2000.

NAGPAL, S., KARAN, UPADHYAY, A., BHARDWAJ, T.R., THAKKAR, A. A review on need and importance of impurity profiling. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 7, p. 62-70, 2011.

OECD – Organization for Economic co-operation and development: Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, n. 129, 2010.

PAIM, C.S NOGUEIRA, D.R. MITJANS, M. LOPEZ, D.R. PEREZ, J.L. STEPPE, M. SCHAPOVAL, E.E.S. VINARDELL, M.P. Biological safety studies of gemifloxacin mesylate and related substances. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 12, p. 805-812, 2013.

RAMAN, N.V.V.S.S. PRASAD, A.V.S.S REDDY, K.R. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 662-667, 2011.

REPETTO, G. PESO, A. ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, v. 3, p. 1125-1131, 2008.

ROBINSON, D.I. Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: a review and perspective. *Organic Process Research & Development*, v. 14, p. 946-959, 2010.

ROY, J. Pharmaceutical impurities – a mini review. *AAPS PharmSciTech*, v. 3, p. 1-8, 2002.

SILVA, D.D. SILVE, E. CARMO, H. Combination effects of amphetamines under hyperthermia – the rol played by oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, p. 637-650, 2014.

WARD, M.W. HUBER, H.J. WEISOVÁ, P. DÜSSMANN, H. NICHOLLS, D.G. PREHN, J.H.M. Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance. *The Journal of Neuroscience*, v. 27, p. 8238-8249, 2007.

VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleous assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis*, v. 25, p. 187-199, 2010.

8. DISCUSSÃO GERAL

8. DISCUSSÃO GERAL

Face ao aumento na demanda em pesquisas pelo desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais ou sintéticos, a preocupação em relação a pureza e qualidade do medicamento desenvolvido torna-se essencial para garantia e segurança do indivíduo (RAHMAN et al., 2006). Para isso, é necessário garantir a qualidade dos reagentes, solventes e materiais de partida utilizados durante a síntese para posterior purificação e armazenamento da substância desenvolvida (RAHMAN et al., 2006; NAGPAL et al., 2011).

No intuito de garantir a segurança dos produtos farmacêuticos, é importante desenvolver metodologias analíticas que sejam capazes de identificar e quantificar a menor quantidade possível das impurezas presentes nos medicamentos (RAHMAN et al., 2006; AHUJA, 2007; NAGPAL et al., 2011).

Dependendo da característica e estrutura química das impurezas identificadas, de acordo com potenciais alertas estruturais já identificados na literatura, torna-se necessária a realização de testes toxicológicos (RAHMAN et al., 2006).

Os testes de caracterização para os fármacos utilizados como referência neste estudo encontram-se apresentados em literaturas anteriores, já que estes compostos foram adquiridos do mesmo fornecedor e previamente analisados. (LANGE, 2013; BARDEN, 2014).

Os ensaios para caracterização das impurezas do fosfato de sitagliptina e da vildagliptina, utilizadas como referências nos estudos foram realizadas por análise térmica, por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria na região do infravermelho (IV), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (MS).

A partir dos resultados encontrados na técnica por DSC, todos os compostos analisados apresentaram termogramas com picos largos e faixa de fusão indefinida. Este fenômeno pode ser decorrente de uma possível degradação das substâncias analisadas durante o processo de fusão ou devido a presença de polimorfos, o que dificulta sua utilização como ferramenta analítica alternativa para caracterização destes analitos no processo de identificação e pureza.

A espectroscopia na região do IV é uma técnica útil na identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas, auxiliando na determinação de pureza e quantificação, sendo útil para identificar e caracterizar estruturas complexas (LOPES e FASCIO, 2004). Através dos espectros de absorção na região do IV obtidos no presente estudo foi possível a identificação dos principais grupos funcionais característicos de cada composto analisado, com base na literatura pesquisada para avaliação dos resultados.

A espectrometria de massas é uma técnica adequada tanto na análise de compostos conhecidos, quanto para compostos cuja estrutura seja completamente desconhecida (SILVERSTEIN, 2013). Os resultados obtidos permitiram a identificação dos compostos analisados através da verificação do padrão de fragmentação e da respectiva massa molecular.

A espectrofotometria na região do UV é muito utilizada como prova de identificação em diversas monografias, sendo adequada em comparação com padrões de referência (FARMACOPEIA, 2010). Os espectros de absorção obtidos das impurezas 1 e 2 do fosfato de sitagliptina na região em 207 nm apresentam elevada absorção, sendo de perfil semelhante ao fármaco.

Trabalhos anteriores utilizaram este mesmo comprimento de onda em estudos da cinética de degradação do fosfato de sitagliptina por eletroforese capilar (LANGE, et al., 2012b). Outra pesquisa realizou testes indicativos de estabilidade por CLAE neste mesmo comprimento de onda. Com o objetivo de tentar reproduzir a metodologia reportada na literatura, utilizando CLAE, optou-se por utilizar o comprimento de onda de 207 nm para avaliação das impurezas (LANGE, et al., 2012a).

Baseado em pesquisas anteriores para análise por CLAE do fosfato de sitagliptina e suas respectivas impurezas, foram realizados testes em coluna C8, água adicionada de 0,3% de trietilamina, pH ajustado para 4,0 e acetonitrila (75:25 v/v), como fase móvel.

Nestas condições, tanto a sitagliptina quanto as impurezas foram detectadas em tempos de retenção muito próximos, sem adequada resolução cromatográfica. Alterações no pH e nas proporções da fase móvel não forneceram resultados diferentes.

Em etapa subsequente, foi utilizada coluna C18 nas mesmas condições cromatográficas testadas anteriormente. Por ser uma coluna mais apolar em comparação à C8, verificou-se que as impurezas não interagiram com a coluna. A modificação da fase móvel para água contendo 0,1% de ácido fórmico (pH 3,5) e acetonitrila, não demonstrou melhoria na separação dos analitos e os mesmos eluíram em igual tempo de retenção.

Na cromatografia em fase reversa, os analitos são mais polares e a fase estacionária utilizada corresponde às colunas apolares. Desta forma, decidiu-se utilizar coluna fenil, pois esta possui maior polaridade em comparação às colunas C8 e C18. A fase móvel utilizada foi composta por água com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. Realizando alterações nas proporções da fase móvel, a melhor condição encontrada foi 60% de fase aquosa, obtendo-se a resolução adequada entre o fármaco e suas impurezas como pode ser observado na figura 2 do capítulo II.

Reduzindo a concentração de ácido fórmico para 0,05%, observou-se menor ruído na linha de base. Portanto, a condição ideal para separação da sitagliptina e suas impurezas foi utilizando coluna XBridge™ fenil (250 mm X 4.6 mm d.i., 5 µm) com eluição isocrática, a fase móvel compreende água com 0,05% de ácido fórmico: acetonitrila (60:40, v/v), vazão de 1,0 mL/min e detecção em 207 nm. Por meio desta metodologia, foi possível alcançar melhoria na resolução e número de pratos.

A Tabela 3 do capítulo II demonstra os valores encontrados para a sitagliptina e as impurezas 1 e 2 em relação aos parâmetros de adequabilidade do sistema. A partir dos resultados obtidos, observa-se que esses estão adequados frente às dificuldades encontradas para analisar pequenas quantidades de amostras e, também, por ser um fármaco recente no mercado, onde são poucos os estudos relacionados às impurezas.

Durante a validação da metodologia analítica, a pureza do pico foi constantemente verificada mostrando não haver interferentes na quantificação dos compostos de interesse.

De acordo com os resultados obtidos e avaliando-se os parâmetros de validação, foi possível confirmar que o método desenvolvido por CLAE e detecção UV foi validado adequadamente colaborando para análise nos laboratórios de

controle de qualidade na indústria farmacêutica para o fármaco sitagliptina e suas respectivas impurezas.

Apesar da necessidade em utilizar a menor concentração de impurezas para detecção, onde os valores analisados foram sempre muito próximos ao limite de quantificação, os resultados obtidos foram amplamente satisfatórios, visto que estão muito semelhantes ao DPR encontrado tanto para a sitagliptina quanto em outros trabalhos que utilizaram diferentes metodologias para validação do fármaco, na presença de produtos de degradação, ou até mesmo junto com outros ativos (EL-BAGARY et al., 2011; LANGE, 2013; PERAMAN et al., 2013; RAMALINGAM et al., 2014).

Além da sitagliptina, existem outros fármacos que pertencem à classe das gliptinas e também necessitam de estudos referentes à avaliação de impurezas de modo a garantir a qualidade e segurança na terapia medicamentosa. Dentre as opções comercialmente disponíveis e que apresentam poucos estudos relacionados ao assunto está a vildagliptina. Desta forma, o presente trabalho também avaliou a vildagliptina e suas principais impurezas de síntese (1 e 2).

Os espectros de absorção das impurezas 1 e 2 da vildagliptina mostram que estes não apresentam absorção adequada mesmo em comprimento de onda menores na faixa analisada. Ainda assim, testes preliminares em CLAE convencional acoplada a detecção em ultravioleta (DAD) foram executados, em razão de representar a técnica mais comumente utilizada nas indústrias e na comunidade acadêmica, de fácil manuseio e interpretação dos resultados.

Baseando-se em trabalhos anteriores, foi utilizado 207 nm como comprimento de onda e utilização das mesmas condições da técnica da literatura (BARDEN et al., 2012).

Utilizando coluna C8 e metanol ou acetonitrila como solvente orgânico, água (0,3% de trietilamina), bem como variações na vazão, pH e proporções na fase móvel, não resultaram em retenção adequada da impureza 2 na coluna. O uso do acetato de amônia 2 mM na fase móvel, utilizado na literatura pesquisada, não gerou resultados satisfatórios (ARAÚJO et al., 2014).

As colunas C18 e ciano foram testadas variando as condições anteriores na fase móvel, porém igualmente não forneceram resultados satisfatórios. Posteriormente,

testou-se coluna XBridge™ fenil (250 mm X 4.6 mm d.i., 5 µm), onde a condição ideal foi eluição isocrática com fase móvel composta por água com 0,1% de ácido fórmico: acetonitrila (40:60 v/v), vazão de 1,0 mL/min e detecção em 207 nm. Foram detectadas a impureza 1 e a vildagliptina, porém, a impureza 2 não foi detectada, havendo necessidade de utilizar uma ferramenta analítica com maior sensibilidade para detecção de todos analitos. Desta forma, optou-se por testar as impurezas e a vildagliptina utilizando CLUE MS/MS, visto que corresponde a uma ferramenta analítica altamente sensível capaz de selecionar a massa exata do composto de interesse de forma a contribuir nas análises de impurezas já que estão presentes em pequenas quantidades e podem comprometer no sucesso da terapia medicamentosa (GUMUSTAS et al., 2013; MAGUIGAD et al., 2008; SWARTZ, 2005).

As análises neste equipamento foram, primeiramente, realizadas utilizando coluna fenil para fase estacionária e fase móvel composta de água e acetonitrila. Foram também realizados testes em coluna amida, C8 e C18 com variações na fase móvel, modo gradiente ou isocrático, vazão e temperatura da coluna.

Utilizando coluna C8, solução aquosa com ácido fórmico 0,1% e a fase orgânica composta de metanol com 0,1% de ácido fórmico e modo gradiente, obteve-se a metodologia mais adequada.

A temperatura da coluna foi mantida em 35 °C, com vazão de 0,3 mL/min. O modo gradiente foi composto por 0/100, 2/80, 3/0 (tempo: % solução aquosa).

Visto que a metodologia aplicada apresentou melhor reprodutibilidade, ficaram estabelecidas as condições dos ensaios para execução da validação analítica de acordo com os guias nacionais e internacionais (BRASIL, 2003; ICH-Q2(R1), 2005).

De acordo com a seletividade observou-se que os analitos de interesse foram separados sem a interferência dos excipientes da formulação, mostrando-se seletivo para a finalidade pretendida de acordo com o observado na figura 5 do capítulo III.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos experimentalmente por meio da análise de diluições sucessivas das amostras observando a relação sinal x ruído. Os valores encontrados mostraram que a vildagliptina apresentou maior sensibilidade seguida da impureza 2, e posteriormente, a impureza 1.

É importante salientar que o limite de quantificação para as impurezas seja menor que o limite de notificação descrito pelas agências regulatórias, pois garantem que o método utilizado é capaz de cumprir com seu objetivo. A partir da metodologia desenvolvida, foram obtidos os valores desejados garantindo com o propósito (BRASIL, 2003; ICH-Q2(R1), 2005).

A avaliação da linearidade foi realizada pela análise da correlação entre as concentrações dos analitos e suas respectivas áreas de acordo com a tabela 1 do capítulo III. A equação da reta foi determinada pelo estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados de modo a confirmar a correlação entre as concentrações dos analitos e suas respectivas áreas. Através da ANOVA foi possível confirmar a regressão linear e não há desvio da linearidade.

O DPR encontrado para a precisão intradia das substâncias analisadas foi inferior a 3% e na precisão interdia inferior a 5%. Da mesma forma, a exatidão e a robustez do método mostraram-se adequados para a finalidade pretendida estando de acordo com os guias oficiais. Trabalhos anteriores, somente desenvolveram metodologia analítica na presença da impureza 2, apresentada no capítulo III, sem a realização de testes que possibilitassem sua quantificação. Desta forma, a presente pesquisa permite a identificação e quantificação de duas principais impurezas de síntese (EL-BAGARY et al., 2011; EL-BAGARY et al., 2016).

Além do desenvolvimento de metodologia analítica para detecção e quantificação das impurezas dos medicamentos, é necessário conhecer a toxicidade destas substâncias que pode ser realizada avaliando as impurezas isoladamente ou na presença do fármaco (BASAK et al., 2007; ICH-Q3A (R2), 2006; ICH-Q3B (R2) 2006; ICH M7, 2014).

Deste modo, a avaliação toxicológica *in vitro* de compostos químicos é uma área de interesse tanto da indústria quanto das autoridades reguladoras, visto que é essencial para garantir o sucesso no desenvolvimento de novos fármacos já que compromete a qualidade e segurança do produto final (POHJALA et al., 2007). No presente estudo, a citotoxicidade foi avaliada utilizando células de fibroblastos, 3T3.

Os ensaios de viabilidade celular auxiliam para prever a toxicidade aguda de compostos baseado no número de células, morfologia e atividade metabólica (POHJALA et al., 2007).

Dentre os testes de viabilidade celular existentes, foram realizados o ensaio do MTT e vermelho neutro. Na avaliação do MTT verificou-se que a impureza 4 da vildagliptina mostrou citotoxicidade em algumas das concentrações testadas (500 e 1000 μM).

No ensaio do vermelho neutro, a vildagliptina não apresentou citotoxicidade e a sitagliptina mostrou-se tóxica nas duas maiores concentrações avaliadas (500 e 1000 μM), assim como a impureza 4 na concentração de 1000 μM .

Estas variações nos resultados dos ensaios podem ser explicadas em virtude dos mecanismos reacionais serem diferentes, fato observado em outras literaturas pesquisadas (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006; ARBO et al., 2014; ARBO et al., 2015).

Sabe-se, também, que o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio comprometem o organismo devido aos danos gerados em função do aumento de radicais livres ou na redução das respostas antioxidantes (MACEDO et al., 2010).

Desta forma, o sistema imune controla as respostas inflamatórias resultantes do dano das funções celulares ou por infecções de microrganismos. Diversas patologias, como desordens vasculares, artrite, câncer e diabetes tipo 2 estão envolvidas em reações inflamatórias (LEE et al., 2014).

A produção de radicais hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio ativa fatores envolvidos no estímulo da resposta inflamatória assim, como outros radicais que modulam a expressão de mediadores pró-inflamatórios (MACEDO et al., 2010).

A partir do ensaio de ROS e RNS observou-se que a sitagliptina (1000 μM) e as impurezas 3 (10 μM) e 4 (10 μM) apresentaram citotoxicidade.

De maneira complementar, o óxido nítrico é uma molécula imunomoduladora que regula várias funções dos linfócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. Testes demonstraram que, quando o NO interage com ânions superóxidos formando peroxinitrito, geram dano tecidual nas células endoteliais nos sítios de inflamação (MACEDO et al., 2010).

No intuito de avaliar a resposta inflamatória nas células, foi realizado o teste do NO utilizando reagente de Griess. Neste ensaio, somente a impureza 3 na concentração de 10 μM apresentou diferença significativa em comparação ao controle. As demais impurezas e os fármacos não induziram resposta inflamatória nas células.

A mitocôndria exerce importante função nas células e mudanças no potencial de membrana mitocondrial fazem parte da transição entre vida e morte celular, onde estudos contribuem na compreensão deste processo (GRIFFITHS, 2000).

O potencial de membrana mitocondrial é altamente negativo (- 180 mV), em função do gradiente quimiosmótico de prótons no interior da membrana mitocondrial, que é usado para sintetizar ATP pela cadeia respiratória (GRIFFITHS, 2000).

Algumas condições, como espécies reativas de oxigênio, depleção de ATP, captação excessiva de Ca^{2+} pela mitocôndria influenciam na transição da membrana mitocondrial, onde a abertura de poros na membrana compromete o potencial influenciando na síntese de ATP com dano celular (GRIFFITHS, 2000).

Da mesma forma, as impurezas com potencial genotóxico podem induzir mutações genéticas, quebras e/ ou rearranjos cromossômicos capaz de promover alterações neoplásicas (ROBINSON, 2010; RAMAN et al., 2011). De acordo com o guia oficial do ICH M7 são apresentadas opções de ensaios que podem ser realizados para a avaliação do controle mutagênico e também determina os níveis de impurezas permitidos de modo a garantir a segurança e qualidade das formulações (ICH M7, 2014).

A realização do teste cometa indicou que tanto os fármacos, sitagliptina e vildagliptina, quanto as respectivas impurezas de síntese não induziram a ocorrência de dano ao DNA (dano direto do DNA) ou citotoxicidade (dano do DNA por necrose ou apoptose).

Até o momento, não são relatados estudos de toxicidade para as impurezas 1, 2, 3 e 4 dos fármacos estudados nesta pesquisa. Portanto, os resultados obtidos

contribuem para a compreensão e avaliação da segurança destes compostos, visando à garantia da qualidade e segurança no âmbito farmacêutico.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

- A caracterização das SQR das impurezas de síntese da sitagliptina e da vildagliptina através das técnicas de espectrofotometria na região do infravermelho, espectrometria de massas e espectrofotometria na região do ultravioleta permitiu conformar a identidade das substâncias;
- O método analítico desenvolvido por CLAE foi validada para a quantificação da sitagliptina e as respectivas impurezas de síntese demonstrou ter adequada especificidade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez;
- A metodologia analítica desenvolvida por CLUE foi validada para a quantificação da vildagliptina e as duas impurezas de síntese demonstrando ser específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto;
- A avaliação da citotoxicidade realizada através do ensaio do MTT demonstrou que somente a impureza 4 da vildagliptina apresentou toxicidade nas concentrações de 500 e 1000 μM ;
- O teste de viabilidade celular realizado por meio do ensaio do vermelho neutro demonstrou que a sitagliptina nas concentrações de 500 e 1000 μM e a impureza 4 na concentração de 1000 μM apresentaram toxicidade;
- A avaliação de RNS e ROS verificou que a sitagliptina na concentração de 1000 μM e as impurezas 3 e 4 na concentração de 10 μM apresentaram citotoxicidade;
- O ensaio do óxido nítrico demonstrou que somente a impureza 3 na concentração de 10 μM apresentou citotoxicidade;
- No teste do potencial de membrana mitocondrial nenhuma das substâncias testadas apresentou resultado significativamente diferente do valor de controle;
- O ensaio cometa verificou que tanto a sitagliptina e vildagliptina quanto as respectivas impurezas não apresentaram genotoxicidade nas concentrações testadas.

10. REFERÊNCIAS

AGRANAT, I. CANER, H. CALDWELL, J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nature Reviews*, v. 1, p. 753-768, 2002.

AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced drug delivery reviews*, v. 59, p. 3-11, 2007.

ALSANTE, K. HUYNH-BA, K. BAERTSCHI, S. REED, R. LANDIS, M. FUMESS, S. OLSEN, B. MOWERY, M. RUSSO, K. ISER, R. STEPHENSON, G. JANSEN, P. Recent trends in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 2: Safety considerations of impurities in pharmaceutical products and surveying the impurity landscape. *American Association of Pharmaceutical Science*, v. 15, p. 237-251, 2014.

ARAÚJO, L. BRITTO, M. CRUZ, T. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 44, p. 509-518, 2000.

ARAÚJO, B.V. ANDRADE, C. LOCK, G.A. PIGATTO, M.C. HASS, S.E. COSTA, T.D. Validation of LC-MS/MS method applied to evaluation of free tissue concentrations of vildagliptin in diabetic rats by microdialysis. *Biomedical Chromatography*, v. 12, p. 1722-1727, 2014.

ARBO, M. D. SILVA, R. BARBOSA, D.J. SILVA, D.D. ROSSATO, L.G. BASTOS, M.L. CARMO, H. Piperazine designer drugs induce toxicity in cardiomyoblast h9c2 cells through mitochondrial impairment. *Toxicology Letters*, v. 229, p. 178-189, 2014.

ARBO, M.D. SILVA, R. BARBOSA, D.J. DIAS DA SILVA, D. SILVA, S.P. TEIXEIRA, J.P. BASTOS, M.L. CARMO, H. *In vitro* neurotoxicity evaluation of piperazine designer drugs in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Applied Toxicology*, v. 36, p. 1-10, 2015.

ARGENTINE, M. OWENS, P. OLSEN, B. Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p. 12-28, 2007.

BALASUBRAHMANYAM, E. BHALME, M. KUMAR, S. L. RAO, S. S. RAVI, P. REDDY, V. K. Evaluating impurities in drugs- Part II. *Pharmaceutical Technology Europe*, v. 24, p. 29-36, 2012a.

BALASUBRAHMANYAM, E. BHALME, M. KUMAR, S. L. RAO, S. S. RAVI, P. REDDY, V. K. Evaluating impurities in drugs- Part III. *Pharmaceutical Technology Europe*, v. 24, p. 26-32, 2012b.

BARBOSA, D.J. CAPELA, J.P. SILVA, R. VILAS-BOAS, V. FERREIRA, L.M. BRANCO, P.S. FERNANDES, E. BASTOS, M.L. CARVALHO, F. The mixture of "ecstasy" and its metabolites is toxic to human SH-SY5Y differentiated cells at in vivo relevant concentrations. *Archives of Toxicology*, v. 88, p. 455-473, 2014.

BARDEN, A.T. BARBARA, S. SCHAPOVAL, E.E.S. STEPPE, M. Stability-indicating RP-LC method for the determination of vildagliptin and mass spectrometry detection

for a main degradation product. *Journal of Chromatographic Science*, v. 50, p. 426-432, 2012.

BARDEN, A.T. PICCOLI, B.L. VOLPATO, N.M. STEPPE, M. A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets. *Analytical Methods*, v. 5, p. 5701-5708, 2013.

BARDEN, A.T. PICCOLI, B.L. SCHAPOVAL, E.E.S., VOLPATO, N.M., STEPPE, M. Capillary zone electrophoresis for determination of vildagliptin (a DPP-4 inhibitor) in pharmaceutical formulation and comparative study with HPLC. *Pharmazie*, v. 69, p. 86-91, 2014.

BARDEN, A. Tese de doutorado: Vildagliptina e associação com metformina: desenvolvimento de metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo da estabilidade. 2014. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*, v. 77, p. 1303-1315, 2009.

BERCU, J.P. DOBO, K.L. GOCKE, E. McGOVERN, T.J. Overview of genotoxic impurities in pharmaceutical development. *International Journal of Toxicology*, v.28, p.468-478, 2009.

BERNARDI, R.M. D'AVILA, F.B. TODESCHINI, V. ANDRADE, J.M.M. FRÖEHLICH, P. BERGOLD, A.M. Main degradation products of dabigatran etexilate evaluated by LC-UV and LC-ESI-MS, degradation kinetics and in vitro cytotoxicity studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 26, p. 660-666, 2015.

BINNOR, A.K. MUKKANTI, K. SURYANARAYANA, M.V. ROY, S.B. Stability-indicating UPLC method for tramadol HCl impurities in the tramadol injection after dilution by infusion fluids (5% dextrose and 0.9% sodium chloride). *Scientia Pharmaceutica*, v. 81, p. 1003-1015, 2013.

BONDE, S. BHADANE, R. GAIKWAD, A., KATALE, D. GAVALI, S.NARENDIRAN, A. A simple and sensitive method for determination of metformin and sitagliptin in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Pharmacy Sciences*, v. 5, p. 463-470, 2013.

BLAIR, M. Diabetes mellitus review. *Urologic Nursing*, v. 36, p. 27-36, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificadas como novos, genéricos e similares. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Acesso em 14 de maio de 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/30/Lancamento-Vigitel-28-04-ok.pdf>>

BUENO, L.M. MANOEL, J.W. GIORDANI, C.F.A. MENDEZ, A.S.L. VOLPATO, N.M. SCHAPOVAL, E.E.S. STEPPE, M. GARCIA, C.V. HPLC method for simultaneous analysis of ticagrelor and its organic impurities and identification of two major photodegradation products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 22-29, 2017.

BUGAY, D.E. Characterization on the solid-state: spectroscopic techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p. 43-65, 2001.

BURUGULA, L. MULLANGI, R. PILLI, N.R. MAKULA, A. LODAGALA, D.S. KANDHAGATLA, R. Simultaneous determination of sitagliptin and simvastatin in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 27, p. 80-87, 2013.

CATHCART, R. SCHWIER, E. AMES, B. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Analytical Biochemistry*, v. 134, p. 111-116, 1983.

CLAS, S-D. DALTON, C.R. HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v.2, p. 311-320, 1999.

CODEVILLA, C.F. LANGE, A.D.C. ANDRADE, J.M.M. SEGALIN, J. FROEHLICH, P.E. BERGOLD, A.M. Photodegradation kinetics of Iodenafile carbonate, structure elucidation of two major degradation products using UPLC-MS/MS and in vitro cytotoxicity. *Analytical Methods*, v. 5, p. 6511-6516, 2013.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, v.26, p. 249-261, 2004.

COSTA, V.M. CARVALHO, F. DUARTE, J.A. BASTOS, M.L. REMIÃO, F. Heart as a target for xenobiotic toxicity: the cardiac susceptibility to oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v. 26, p. 1285-1311, 2013.

COSTA, M.C.N. BARDEN, A.T. ANDRADE, J.M.M. OPPE, T.P. SCHAPOVAL, E.E.S. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. *Talanta*, v. 119, p. 367-374, 2014.

CUI, Y. SONG, X. REYNOLDS, M. CHUANG, K. XIE, M. Interdependence of drug substance physical properties and corresponding quality control strategy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, p. 489-512, 2012.

DAVADRA, P.M. MEPAL, V.V. JAIN, M.R. JOSHI, C.G. BAPODRA, A.H. A validated UPLC method for the determination of process-related impurities in azathioprine bulk drug. *Analytical Methods*, v. 3, p. 198-204, 2011.

DHILLON, S. Sitagliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Adis Drug Evaluation*, v.70, p. 489-512, 2010.

DOW, K.L. HANSEN, M.M. PACK, B.W. PAGE, T.J. BAERTSCHI, S.W. The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.12, p.1404-1417, 2013.

DUEZ, H. CARIOU, B. STAELS, B. DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology*, v. 83, p. 823-832, 2012.

EL-ANEED, A. COHEN, A. BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 44, p. 210-230, 2009.

EL-BAGARY, R. ELKADY, E.F. AYOUB, B.M. Liquid chromatographic methods for the determination of vildagliptin in the presence of its synthetic intermediate and the simultaneous determination of pioglitazone hydrochloride and metformin hydrochloride. *International Journal of Biomedical Science*, v. 7, p. 201-208, 2011a.

EL-BAGARY, R. ELKADY, E. F. AYOUB, B. M. Liquid chromatographic determination of sitagliptin either alone or in ternary mixture with metformin and sitagliptin degradation product. *Talanta*, v. 85, p. 673-680, 2011b.

EL-BAGARY, R. ELKADY, E.F. FOUAD, M.A. EL-SHERIF, Z.A. KADRY, A.M. AYOUB, B.M. Development and validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of sitagliptin and simvastatin in the presence of their degradation products in bulk drug mixture and combined pharmaceutical preparations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 37, p. 1895-1908, 2014.

EL-BAGARY, R. AZZAZY, H.M.E. EL-KADY, E.F. FAROUK, F. Simultaneous determination of metformin, vildagliptin and 3-amino-1-adamantanol in human plasma: application to pharmacokinetic studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 39, p. 195-202, 2016.

EMERCE, E. COK, I. DEGIM, T. Determination of the impurities in drug products containing montelukast and in silico/in vitro genotoxicological assessments of sulfoxide impurity. *Toxicology Letters*, v. 238, p. 90-99, 2015.

ERMER, J. MILLER, J.H.McB. Method validation in pharmaceutical analysis. A guide to best practice. Weinheim, 2005.

ERTÜRK, S. AKTAS, E.S. ERSOY, L. FIÇICIOĞLU, S. An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.33, p. 1017-1023, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

Food and Drug Administration. Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/201280lbl.pdf>.
Acessado em fevereiro de 2014.

Food and Drug Administration. Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021995s019lbl.pdf>
Acessado em fevereiro de 2014.

FOTAKIS, G. TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006.

FRIEAUFF, W. PÖTTER-LOCHER, F. CORDIER, A. SUTER, W. Automatic analysis of the in vitro micronucleous test on V79 cells. *Mutation Research*, v. 413, p. 57-68, 1998.

GARCÍA, A. RUPÉREZ, F.J. CEPPA, F. PELLATI, F. BASBAS, C. Development of chromatographic methods for the determination of genotoxic impurities in cloperastine fendizoate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 61, p. 230-236, 2012.

GRIFFITHS, E.J. Mitochondria- potential role in cell life and death. *Cardiovascular Research*, v. 46, p. 24-27, 2000.

GRISHAM, M.B. JOURD'HEUIL, D. WINK, D.A. Nitric oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology*, v. 276, p. G315-G321, 1999.

GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, p. 12-17, 2007.

GUARIGUATA, L., WHITING, D.R., HAMBLETON, I., BEAGLEY, J. LINNENKAMP, U., SHAW, J. E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and clinical practice*, v. 103, p. 137-149, 2014.

GUMUSTAS, M. KURBANOGLU, S. USLU, B., OZKAN, S.A. UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters. *Chromatographia*, v. 76, p. 1365-1427, 2013.

HANSEN, K.B. BALSELLS, J. DREHER, S. HSIAO, Y. KUBRY, M. PALUCKI, M. RIVERA, N. STEINHUEBEL, D. ARMSTRONG III, J.D. ASKIN, D. GRABOWSKI, E.J.J. First generation process for the preparation of the DPP-IV inhibitor sitagliptin. *Organic Process Research & Development*, v. 9, p. 634-630, 2005.

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

HOLM, R. ELDER, D.P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 118-135, 2016.

HUANG, T. YAN, L. ZHENG, S. WANG, Y. WANG, X. FAN, L. LI, C.ZHAO, Y. MARTYNIUK, C.J. Discriminating modes of toxic action in mice using toxicity in BALB/c mouse fibroblast (3T3) cells. *Chemosphere*, v. 188, p. 73-80, 2017.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Impurities in New Drug Substances Q3A(R2), 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Impurities in New Drug Products Q3B(R2), 2006.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1), 2011.

ICH - International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7, 2014.

IRONS, B. MINZE, M.G. Drug treatment of type 2 diabetes mellitus in patients for whom metformin is contraindicated. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, v.7, p. 15-24, 2014.

JAIN, D., BASNIWAL, P.K. Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 11-35, 2013.

KADIVAR, M.H. SINHA, P.K. KUSHWAH, D. JANA, P. SHARMA, H. BAPODRA, A. Study of impurity carryover and impurity profile in febuxostat drug substance by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 56, p. 749-757, 2011.

KALARIYA, P.D. RAJU, B. BORKAR, R.M. NAMDEV, D. GANANANDHAMU, S. NANDEKAR, P.P. SANGAMWAR, A.T. SRINIVAS, R. Characterization of forced degradation products of ketorolac tromethamine using LC/ESI/Q/TOF/MS/MS and in silico toxicity prediction. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 70, p. 2089-2109, 2014.

KAZSOKI, A. FEJÖS, I. SOHAJDA, T. ZHOU, W. HU, W. SZENTE, L. BÉNI, S. Development and validation of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the enantiomeric separation of vildagliptin enantiomers. *Electrophoresis*, v. 37, p. 1318-1325, 2016.

KEATING, G.M. Vildagliptin: a review of its use in type 2 diabetes melitus. *Adis Drug Evaluation*, v. 70, p. 2089-2109, 2010.

KONDRA, S.B. MADIREDDY, V. CHILUKURI, M. PAPADASU, N. JONNALAGADDA, L. A validated stability-indicative UPLC method for nilotinib hydrochloride for the determination of process-related and degradation impurities. *Journal of Chromatographic Science*, v. 52, p. 880-885, 2013.

KUMAR, N. DEVINENI, S.R. SINGH, G. KADIRAPPA, A. DUBEY, S.K. KUMAR, P. Identification, isolation and characterization of potential process-related impurity and its degradation product in vildagliptin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 119, p. 114-121, 2016.

LANÇAS, F.M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANGE, A.D.C. GASPERIN, F.T. PASSOS, C.S. TODESCHINI, V. VOLPATO, N.M. SCHAPOVAL, E.E.S. Stability-Indicating LC Assay with Determination of System Suitability Limits by a Robustness Test for Sitagliptin in Tablets and Assessment of Cytotoxicity for Degradation Products. *Current Pharmaceutical Analysis*, v.8, p. 360-369, 2012.a

LANGE, A.D.C. GASPERIN, F.T. BARTH, A.B. TODESCHINI, V. VOLPATO, N.M. SCHAPOVAL, E.E.S. Application of factorial design and study of photodegradation kinetics for the determination of sitagliptin by capillary electrophoresis. *Current Analytical Chemistry*, v.8, p.116-123, 2012.b

LANGE, A. Tese de Doutorado: Sitagliptina: desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicáveis a estudos de estabilidade. 2013. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LAUSTER, C.D. MCKAVENEY, T.P. MUENCH, S.V. Vildagliptin: a novel oral therapy for type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Health-System Pharmacists.*, v. 64, p. 1265-1273, 2007.

LEE, K.P. SUDJARWO, G.W. KIM, J-S. DIRGANTARA, S. MAENG, W.J. HONG, H. The anti-inflammatory effect of Indonesian *Areca catechu* leaf extract *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research and Practice*, v. 8, p. 267-271, 2014.

LEE, M. KERNS, E. LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 18, p. 187-279, 1999.

LEBEL, C.P. ISCHIROPOULOS, H. BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2,7-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, v.5, p. 227-231, 1992.

LI, H. YANG, W. HAO, J. FAN, S. YANG, S. GUO, Q. Experimental measurement and thermodynamic models for solid-liquid equilibrium of 3-amino-1-adamantanol in different pure solvents and in (H₂O + ethanol) binary mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, v.215, p. 127-134, 2016.

LIU, D.Q. CHEN, T.K. MCGUIRE, M.A. KORD, A.S. Analytical control of genotoxic impurities in the pazopanib hydrochloride manufacturing process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 50, p. 144-150, 2009.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, v. 96, p. 147-152, 2000.

LOPES, W.A. FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, v.27, p. 670-673, 2004.

LURIE, I.S. BERRIER, A.L. CASALE, J.F. IIO, R. BOZENKO JR, J.S. Profiling of illicit fentanyl using UHPLC-MS/MS. *Forensic Science International*, v. 220, p. 191-196, 2012.

MACEDO, R.C. BOLIN, A.P. MARIN, D.P. OTTON, R. Astaxanthin addition improves human neutrophils function: *in vitro* study. *European Journal of Nutrition*, v. 49, p. 447-457, 2010.

MALATI, V. RAGHUPATIREDDY, A. MUKKANTI, K. SURYANARAYANA, M.V. Identification of prasugrel (an antiplatelet drug) impurities by LC-MS/MS, rapid determination of prasugrel hydrochloride-related substances, and degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms by stability indicating ultra-performance liquid chromatographic method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 36, p. 61-79, 2013.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, p. 214-222, 2009.

MANNERSTRÖN, M. TOIMELA, T. SARKANEN, J-R, HEINONEN, T. Human BJ Fibroblasts is an alternative to mouse BALB/c cells in *in vitro* neutral red uptake assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 121, p. 109-115, 2017.

MASCOLO, M.G. PERDICHIZZI, S. ROTONDO, F. MORANDI, E. GUERRINI, A. SILINGARDI, P. VACCARI, M. GRILLI, S. COLACCI, A. BALB/c 3T3 cell transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicology in Vitro*, v. 24, p. 1292-1300, 2010.

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.

MCGOVERN, T. JACOBSON-KRAM, D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, p. 790-795, 2006.

MOWAKA, S. MOHAMED, D. Novel contribution to the simultaneous analysis of certain hypoglycemic drugs in the presence of their impurities and degradation

products utilizing UPLC-MS/MS. *The Royal Society of Chemistry Advances*, v. 5, p. 60467-60481, 2015.

MONE, M.K. JAIN, P. KURHADE, S. SONUNE, D.P. KADUSKAR, R.D. Development and validation of a liquid chromatographic enantiomer separation method for the estimation of (S)- enantiomer in sitagliptin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 5, p. 2382-2386, 2014.

MURTHY, M.V. KRISHNAIAH, C. KUMAR, R. MUKKANTI, K. Development of stability-indicating UPLC method for determination zolpidem tartrate and its product related variants in drug substance and drug products. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 36, p. 836-851, 2013.

NAGPAL, S., KARAN, UPADHYAY, A., BHARDWAJ, T.R., THAKKAR, A. A review on need and importance of impurity profiling. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 7, p. 62-70, 2011.

NAIR, M. Diabetes mellitus part 1: physiology and complications. *British Journal of Nursing*, v. 16, p. 184-189, 2007.

NEUMILLER, J. J; SETTER, S. M. Review of linagliptin for the treatment of type 2 diabetes. *Clinical Therapeutics*, v. 34, p. 993-1005, 2012.

NIROGI, R. KANDIKERE, V. MUDIGONDA, K. KOMARNENI, P. ALETI, R. BOGGAVARAPU, R. Sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in human plasma using liquid-liquid extraction. *Biomedical Chromatography*, v.22, p. 214-222, 2008.

NOVÁKOVÁ, L. MATYSOVÁ, L. SOLICH, P. Advantage of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, v. 68, p. 908-918, 2006.

OECD – Organization for Economic co-operation and development: Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, n. 129, 2010.

OLSEN, B.A. CASTLE, B.C. MYERS, D.P. Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, p. 796-805, 2006.

OLIVEIRA, M.A. YOSHIDA, M.I. GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. *Química Nova*, v. 34, p. 1224-1230, 2011.

PAIM, C.S NOGUEIRA, D.R. MITJANS, M. LOPEZ, D.R. PEREZ, J.L. STEPPE, M. SCHAPOVAL, E.E.S. VINARDELL, M.P. Biological safety studies of gemifloxacin mesylate and related substances. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 12, p. 805-812, 2013.

PAVIA, D.L. LAMPMAN, G.M. KRIZ, G.S. VYVYAN, J.R. *Introdução à espectroscopia*. 4 ed, São Paulo, 2010.

PERAMAN, R. GOWRA, C.S. REDDY, Y.P. PERURU, K.K. Stability- indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and sitagliptin phosphate in dosage forms. *Chromatographia*, v. 76, p. 1153-1162, 2013.

PEREIRA, L.C. SOUZA, A.O. PAZIN, M. DORTA, D.J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 25, p. 1-14, 2012.

PHARNE, A.B. SANTHAKUMARI, B. GHEMUD, A.S. JAIN, H.K. KULKARNI, M.J. Bioanalytical method development and validation of vildagliptin a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor by RP-HPLC method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, p. 119-123, 2012.

POHJALA, L. TAMMELA, P. SAMANTA, S. YLI-KAUHALUOMA, J. VUORELA, P. Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays. *Analytical Biochemistry*, v. 362, p. 221-228, 2007.

PONTAROLO, R. GIMENEZ, A.C. FRANCISCO, T.M.G. RIBEIRO, R.P. PONTES, F.L.D. GASPARETTO, J.C. Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method. *Journal of Chromatography B*, v. 965, p. 133-141, 2014.

RAHMAN, N. AZMI, S.N.H. WU, H-F. The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 11, p. 69-74, 2006.

RAJU, T.S. KALYANARAMAN, L. REDDY, V.V. SWAMY, P.Y. Development and validation of an UPLC method for the rapid separation of positional isomers and potential impurities of rivastigmine hydrogen tartrate in drug substance and drug product. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 35, p. 896-911, 2012.

RAMALINGAM, P. BHASKAR, V.U. REDDY, Y.P. KUMAR, K.V. Stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of sitagliptin and simvastatin in tablets. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 76, p.407-414, 2014.

RAMAN, N.V.V.S.S. PRASAD, A.V.S.S REDDY, K.R. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug substances: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 662-667, 2011.

RAMESH, T. RAO, P.N. SURESH, K. Enantiomeric separation of sitagliptin by a validated chiral liquid chromatographic method. *Analytical Methods*, v. 6, p. 223-228, 2014.

REDDY, A.V.B. VENUGOPAL, N. MADHAVI, G. REDDY, G. MADHAVI, V. A selective and sensitive UPLC-MS/MS approach for trace level quantification of four potential genotoxic impurities in zolmitriptan drug substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 84, p. 84-89, 2013.

REDDY, S. AHMED, I. AHMAD. I. MUKHOPADHYAY, A. THANGAM, S. Development and validation of a method for simultaneous estimation of metformin and sitagliptin in human plasma by LC-MS-MS and its application in a bioequivalence study. *Journal of Chromatographic Science*, v. 53, p. 1549-1556, 2015.

REDDY, V.B. YUSOP, Z. JAAFAR, J. ARIS, A.B. MAJID, Z.A. UMAR, K. TALIB, J. Development and validation of a selective, sensitive and stability indicating UPLC-MS/MS method for rapid, simultaneous determination of six process related impurities in darunavir drug substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 128, p. 141-148, 2016.

REPETTO, G. PESO, A. ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, v. 3, p. 1125-1131, 2008.

ROBINSON, D.I. Control of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients: a review and perspective. *Organic Process Research & Development*, v. 14, p. 946-959, 2010.

RODRIGUEZ-ALLER, M. GURNY, R. VEUTHEY, J-L. GUILLARME, D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1292, p. 2-8, 2013.

ROGERO, S.O. LUGÃO, A.B. IKEDA, I.T. CRUZ, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROJAS, E. LOPEZ, M.C. VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, v. 722, p.225-254, 1999.

ROY, J. Pharmaceutical impurities – a mini review. *AAPS PharmSciTech*, v. 3, p. 1-8, 2002.

ROWE R.C. SHESKEY, P.J. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 5 ed, 2006.

SAKAI, A. BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, v. 14, p. 367-373, 2007.

SALIM, M. EL-ENANY, N. BELAL, F. WALASH, M. PATONAY, G. Simultaneous determination of sitagliptin and metformin in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis and its application to human plasma analysis. *Analytical Chemistry Insights*, v. 7, p. 31-46, 2012.

SCADUTO, R.C. GROTYOHANN, L.W. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal*, v. 76, p. 469-477, 1999.

SciFinder. Disponível em:
<<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>> Acessado em
junho de 2014.

SCHEEN, A.J. Pharmacokinetics of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 12, p. 648-658, 2010.

SHAH, P.A. SHAH, J.V. SANYAL, M. SHRIVASTAV, P.S. LC- tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of metformin and sitagliptin in human plasma after ion-pair solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 131, p.64-70, 2016.

SHANTIKUMAR, S. SREEKANTH, G. SURENDRANATH, K.V. JAFERVALLI, S. SATHEESHKUMAR, N. Compatibility study between sitagliptin and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 115, p. 2423-2428, 2014.

SCHERF-CLAVEL, M. HÖGGER, P. Analysis of metformin, sitagliptin and creatinine in human dried blood spots. *Journal of Chromatography B*, v. 997, p. 218-228, 2015.

SILVA, G.R. CONDESSA, F.A. PIANETTI, G.A. NUNAN, E.A. CAMPOS, L.M.M. Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea das impurezas timina e timidina na matéria-prima estavudina. *Química Nova*, v. 31, p. 1686-1690, 2008.

SILVA, D.D. CARMO, H. LYNCH, A. SILVA, E. An insight into the hepatocellular death induced by amphetamines, individually and in combination: the involvement of necrosis and apoptosis. *Archives Toxicology*, v. 87, p. 2165-2185, 2013.

SILVA, D.D. SILVE, E. CARMO, H. Combination effects of amphetamines under hyperthermia – the role played by oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, p. 637-650, 2014.

SILVA, G.R. CONDESSA, F.A. PIANETTI, G.A. NUNAN, E.A. CAMPOS, L.M.M. Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea das impurezas timina e timidina na matéria-prima estavudina. *Química Nova*, v. 31, p. 1686-1690, 2008.

SILVERSTEIN, R.M. WEBSTER, F.X. KIEMLE, D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed, Rio de Janeiro, 2013.

SPILOVSKA, K. ZEMEK, F. KORABENCNY, J. NEPOVIMOVA, E. SOUKUP, O. WINDISCH, M. KUČA, K. Adamantane – A Lead Structure for Drugs in Clinical Practice. *Current Medicinal Chemistry*, v. 23, 3245-3266, 2016.

SURESH, P. SRINIVAS, N. MULLANGI, R. A concise review of the bioanalytical methods for the quantitation of sitagliptin, and important dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibitor, utilized for the characterization of the drug. *Biomedical Chromatography*, v. 30, p. 749-771, 2016.

TALLURI, M.V.N.K. DHARAVATH, S. KALARIYA, P.D. PRASANTH, B. SRINIVAS, R. Structural characterization of alkaline and oxidative stressed degradation products of lurasidone using LC/ESI/QTOF/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 105, p. 1-9, 2015.

TATSCH, E. BOCHI, G.V. PEREIRA, R.S. KOBER, H. AGERTT, V.A. CAMPOS, M.M.A. GOMES, P. DUARTE, M.M.M.F. MORESCO R.N. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clinical Biochemistry*, v. 44, p. 348-350, 2011.

THOMAS, S. JOSHI, S.C. VIR, D. AGARWAL, A. RAO, R.D. SRIDHAR, I. XAVIER, C.M. MATHELA, C.S. Identification, characterization and quantification of a new impurity in deferasirox active pharmaceutical ingredient by LC-ESI-QT/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 63, p. 112-119, 2012.

WARD, M.W. HUBER, H.J. WEISOVÁ, P. DÜSSMANN, H. NICHOLLS, D.G. PREHN, J.H.M. Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance. *The Journal of Neuroscience*, v. 27, p. 8238-8249, 2007.

WEYERMANN, J. LOCHMANN, D. ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, p. 369-376, 2005

WILLARD, H. MERRITT, L. DEAN, J. *Análise Instrumental*. Estados Unidos, Nova Iorque, 5ª ed., 1974.

WU, C-S. WANG, C-H. ZHANG, J-L. WANG, D.M. TONG, Y-F. WU, S. HUANG, H-W. NING, B-M. Separation, determination of six impurities in methotrexate drug substance using ultra-performance liquid chromatography. *Chinese Chemical Letters*, v. 25, p. 447-450, 2014.

VENKATARAO, P. KUMAR, M.N. KUMAR, R. Novel validated stability-indicating UPLC method for the estimation of naproxen and its impurities in bulk drugs and pharmaceutical dosage form. *Scientia Pharmaceutica*, v. 80, p. 965-976, 2012.

VENUGOPAL, A. REDDY, V.B. MADHAVI, G. Development and validation of a systematic UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of three phenol impurities in ritonavir. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 90, p. 127-133, 2014.

ZHANG, K. MA, P. JING, W. ZHANG, X. A developed HPLC method for the determination of alogliptin benzoate and its potential impurities in bulk drug and tablets. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 10, p. 152-158, 2015.

ZOTOU, A. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, p. 554-569, 2012.