

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

***SITAGLIPTINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS APLICÁVEIS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE***

ALINI DALL CORTIVO LANGE

Porto Alegre, 2013

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

**SITAGLIPTINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS APLICÁVEIS A ESTUDOS DE ESTABILIDADE**

Tese apresentada por **ALINI DALL CORTIVO
LANGE** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas.

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

Coorientador: Prof^a. Dr. Nadia M. Volpato

Porto Alegre, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Loureiro Mendez
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Profa. Dr. Valéria Pereira de Sousa
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Dall Cortivo Lange, Alini
Sitagliptina: Desenvolvimento e validação de
métodos analíticos aplicáveis a estudos de
estabilidade / Alini Dall Cortivo Lange. -- 2013.
189 f.

Orientador: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2013.

1. Fosfato de sitagliptina. 2. Controle de
Qualidade. 3. Estudo de estabilidade. I. Scherman
Schapoval, Elfrides Eva, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Elfrides Schapoval que me orientou em busca do conhecimento e crescimento profissional. Agradeço por compartilhar comigo sua atenção, sabedoria e otimismo. Sua confiança e dedicação foram fundamentais para conclusão desta etapa.

À Profa. Dr. Nadia M. Volpato pela coorientação, disponibilidade, amizade e pelo importante auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho. Sua visão analítica foi muito importante e esclarecedora.

Aos professores Dr. Cássia Garcia, Dr. Martin Steppe e Dr. Tércio Oppe pelo exemplo profissional e auxílio. Aos amigos do LCQFar: Alianise, Amanda, Camila, Gustavo, Jaison, Lorena, Márcia, Mariana, Nathalie, Maximiliano e Vítor pela amizade e auxílios prestados. Em especial aos colegas e amigos: Clésio, Diogo e Rubia. Às bolsistas de iniciação científica Franciele Gasperin e Ana Paula Batisttel pela dedicação e colaboração na execução deste trabalho.

A minha colega, amiga e irmã de coração Letícia Lenz Sfair pela amizade, companheirismo, auxílio e experiências compartilhadas.

À Pfizer pela oportunidade, em especial aos colegas: Carolina, Daniela, Ednilson, Gelatti, Gerson, Hamilton, João, Marcello, Pompeo, Vanessa S. e Vanessa W.

Ao Paulo Aguiar Jr. pelo amor, companheirismo e compreensão, extremamente importantes nesse momento.

Aos meus pais Vicente e Neusa, que sempre incentivaram meus estudos, agradeço pela dedicação ao longo dos anos, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Aos meus irmãos Luciano, Lucirene, Camila e Lucas pelo apoio, amor e amizade e aos meus cunhados Eliete, Junior e Gian pela torcida e incentivo constante. Aos sobrinhos, Nicolas e Luan que tanto alegam minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação desta Faculdade pela oportunidade de aprimoramento científico e crescimento pessoal e aos professores do PPGCF pelas disciplinas disponibilizadas.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

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. Assim, este exemplar encontra-se dividido da seguinte forma:

- ✓ Introdução;
- ✓ Objetivo geral e objetivos específicos;
- ✓ Revisão bibliográfica;
- ✓ Capítulo I: Caracterização da substância química de referência (SQR) fosfato de sitagliptina;
- ✓ Capítulo II: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação qualitativa do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos;
- ✓ Capítulo III: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos – Encarte de publicações;
- ✓ Capítulo IV: Ensaio de dissolução para os comprimidos revestidos de fosfato de sitagliptina – Encarte da publicação;
- ✓ Capítulo V: Isolamento e Identificação dos produtos de degradação majoritários obtidos em condições ácidas – Encarte da publicação;
- ✓ Discussão geral;
- ✓ Conclusões;
- ✓ Referências.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	03
2. OBJETIVOS	07
2.1. Objetivo geral.....	07
2.2. Objetivos específicos.....	07
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Aspectos gerais.....	11
3.2. Atividade Hipoglicemiante.....	13
3.3. Indicações.....	13
3.4. Mecanismo de ação.....	14
3.5. Farmacodinâmica e Farmacocinética.....	15
3.6. Reações adversas.....	16
3.7. Descrição do fármaco.....	16
3.8. Determinação qualitativa e quantitativa.....	17
3.9. Métodos analíticos.....	18
3.9.1. Espectrofotometria na região do UV.....	18
3.9.2. Eletroforese capilar.....	18
3.9.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	19
3.10. Ensaio de dissolução.....	20
3.11. Estabilidade-Isolamento e identificação.....	21
4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA FOSFATO DE SITAGLIPTINA	23
4.1. Introdução.....	25
4.2. Fosfato de sitagliptina – SQR.....	25
4.3. Parte experimental.....	26
4.3.1. Caracterização da SQR fosfato de STG.....	26
4.3.1.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	26
4.3.1.1.1. Resultados e discussão.....	26
4.3.1.2. Determinação da faixa e do ponto fusão.....	27
4.3.1.2.1. Resultados e discussão.....	28
4.3.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	28
4.3.1.3.1. Resultados e discussão.....	29

4.3.1.4. Espectrometria de massas.....	30
4.3.1.4.1. Resultados e discussão.....	30
4.3.1.5. Ressonância magnética nuclear.....	31
4.3.1.5.1. Resultados e discussão.....	32
4.4. Conclusões.....	34
5. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DO FOSFATO DE SITAGLIPTINA EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS.....	35
5.1. Introdução.....	37
5.2. Produto Farmacêutico.....	38
5.3. Parte experimental.....	38
5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	38
5.3.1.1. Condições cromatográficas.....	38
5.3.1.2. Resultados e discussão.....	39
5.3.2. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV).....	40
5.3.2.1. Condições espectrofotométricas.....	40
5.3.2.2. Resultados e discussão.....	40
5.3.3. Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
5.3.3.1. Condições cromatográficas.....	41
5.3.3.2. Resultados e discussão.....	42
5.3.4. Eletroforese capilar (EC).....	43
5.3.4.1. Condições eletroforéticas.....	43
5.3.4.2. Resultados e discussão.....	45
5.4. Conclusões.....	46
6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO FOSFATO DE SITAGLIPTINA EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS.....	47
6.1. Introdução.....	49
6.2. Application of factorial design and study of photodegradation kinetics for the determination of sitagliptin by capillary electrophoresis	51
6.3. 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 formed by UV-C light.....	53

7. CAPÍTULO IV – ENSAIO DE DISSOLUÇÃO PARA OS COMPRIMIDOS DE FOSFATO DE SITAGLIPTINA.....	57
7.1. Introdução.....	59
7.2. Sitagliptin Phosphate: development of a dissolution method for coated tablets based on <i>in vivo</i> data for improving medium sensitivity.....	61
8. CAPÍTULO V – ESTUDO DA ESTABILIDADE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIOS OBTIDOS.....	63
8.1. Introdução.....	65
8.2. Sitagliptin Phosphate: isolation and identification of two degradation products formed in acid condition and determination of cytotoxicity in vitro.....	67
9. DISCUSSÃO GERAL.....	69
10. CONCLUSÕES.....	79
11. REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura química do fosfato de sitagliptina.....	4
FIGURA 3.1. Prevalência estimada do diabetes melittus no mundo.....	12
FIGURA 3.2. Mecanismo de ação do fosfato de sitagliptina.....	15
FIGURA 4.1. Curva de DSC da SQR fosfato de sitagliptina, obtida em atmosfera de nitrogênio.....	27
FIGURA 4.2. Espectro de absorção na região do infravermelho da SQR fosfato de sitagliptina.....	29
FIGURA 4.3. Espectro de massas do fosfato de sitagliptina SQR.....	31
FIGURA 4.4. Espectro de RMN 1H em metanol deuterado de fosfato de sitagliptina SQR.....	32
FIGURA 5.1. Cromatograma obtido por CCD para a SQR fosfato de sitagliptina (1), STG comprimidos revestidos (2) e glibenclamida (3) revelados por luz UV-254 nm.....	39
FIGURA 5.2. Sobreposição dos espectros de absorção na região do UV da SQR fosfato de sitagliptina e dos comprimidos revestidos.....	41
FIGURA 5.3. Sobreposição dos cromatogramas obtidos da SQR fosfato de sitagliptina (___) e dos comprimidos revestidos de fosfato de sitagliptina (---) na concentração de 100 µg/ml	43
FIGURA 5.4. Sobreposição e deslocamento do eletroferograma da SQR fosfato de sitagliptina (a) e STG comprimidos revestidos (b)	45
FIGURA 6.2.1. Chemical structure of sitagliptin	55
FIGURA 6.2.2. Representative electropherograms under the finally recommended conditions, (50 mM) TRIS (pH 10.6) and (75 mM) SDS, at 25 °C and voltage was 30 kV for A) STG standard (a) and IS (b); B) simulated sample of excipients; C) STG solution after acid degradation (a) and IS (b); D) STG solution after basic degradation (a), IS (b) and degradation product (c); E) STG solution after exposure to UVC light (a) and IS (b); F) STG solution after exposure to 6% hydrogen peroxide (a) and IS (b).....	65
FIGURA 6.2.3. Plots of concentration (a) - zero-order reaction; log concentration (b) - first-order reaction; and reciprocal of concentration (c) - second-order reaction of remaining sitagliptin versus time.....	69
FIGURA 6.3.1. Chemical structure of sitagliptin phosphate.....	78
FIGURE 6.3.2. Chromatograms and the full scan mass spectra of STG (m/z 408.1) and degradation studies of STG samples (100 µg/ml). A) STG reference substance solution (A ₁), STG sample solution (A ₂), simulated sample solution of the excipients (A ₃); B) after basic hydrolysis; C) after acidic hydrolysis; D) after oxidation; E) after exposure to UV-C light; E) after exposure to temperature of 60 °C.....	88
FIGURE 6.3.3. Results obtained by in vitro cytotoxicity assay for	

degraded samples of sitagliptin against mononuclear cells. (a) values significantly different of the control group; (b) values significantly different of the STG 50, 100, 200 and 500 µg/ml; (c) values significantly different of the Triton X-100.....	92
FIGURE 7.1. Chemical structure of sitagliptin phosphate.....	100
FIGURE 7.2. Dissolution profiles of sitagliptin phosphate coated tablets (n = 6) using acetate buffer pH 4.5 (A), water (B), HCl 0,01M (C), HCl 0,1M (D) and buffer phosphate buffer pH 6.8, at 50 rpm.....	106
FIGURA 7.3. Overlay of chromatograms of STG coated tablets (A) and sample simulated excipients (B) by LC method.....	107
FIGURA 7.4. Plot of mean percentage of dose absorbed versus mean percentage of dose dissolved for STG phosphate coated tablets.....	108
FIGURA 8.1. Structure of sitagliptin phosphate.....	122
FIGURA 8.2. Plots for concentration [zero-order reaction (A)], log of concentration [first-order reaction (B)] and reciprocal of concentration [second-order reaction (C)] of remaining sitagliptin versus time.....	127
FIGURA 8.3. Chromatograms of STG reference standard solution during the degradation process in acid medium (HCl 2.5M) at 60°C (time 0-6 hours).....	129
FIGURA 8.4. Analysis by UPLC-UV/MS of samples: STG reference standard, STG coated tablets, DP1 isolated and DP2 isolated.....	130
FIGURA 8.5. Mass spectrum and identification of degradation products. The figure (A) refers to DP1 and (B) refers to DP2.....	132
FIGURA 8.6. Chemical reaction of sitagliptin in acid medium.....	133
FIGURA 8.7. Cytotoxicity study of STG and DPs at concentrations of 10.0, 50.0, 100.0 and 250.0 µg.mL ⁻¹ . Values of 100% indicates total cellular viability. Triton X-100 1% represents cell injury (positive control). A10, A11, A12 and A13: samples of the degradation products after degradation in HCl 2.5M for 6h); A14: sample of STG reference standard.....	134

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção do fosfato de sitagliptina e suas respectivas atribuições.....	29
TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ¹ H para o fosfato de sitagliptina SQR em metanol deuterado.....	33
TABELA 5.1. Condições cromatográficas empregadas para a análise qualitativa e quantitativa do fosfato de sitagliptina por CLAE.....	42
TABELA 5.2. Condições eletroforéticas empregadas na análise qualitativa e quantitativa do fosfato de sitagliptina por eletroforese capilar (MECK).....	44
TABELA 6.2.1. Factors and levels applied to the robustness test by the MECK method.....	60
TABELA 6.2.2. Intra-day and inter-day precision data of the sitagliptin in samples of pharmaceutical formulation by the MEKC method.....	64
TABELA 6.2.3. STG accuracy study by CE method	66
TABELA 6.2.4. Plackett-Burman experimental design, the response obtained for each experiment and the effects of the investigated factors on robustness evaluation by MEKC.....	67
TABELA 6.2.5. Results of the residual concentration of sitagliptin in methanol after photodegradation, using the MEKC method	68
TABELA 6.3.1. Intra-day and inter-day precision data for STG phosphate assay in coated tablets by HPLC.....	89
TABELA 6.3.2. Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.....	90
TABELA 6.4.1. Intra-day and inter-day precision results for STG dissolved in 900 ml the medium and analyzed by LC method.....	102
TABELA 6.4.2. Mean recovery for STG added through by mean of the powdered tablets poll coated tablets.....	103
TABELA 7.1. Degradation rate constant (k), half-life (t _{1/2}) and t ₉₀ for STG coated tablets and STG reference standard in solutions submitted to degradation in HCl 2.5M at 60 °C.....	108
TABELA 7.2. Mean recovery for STG added by mean of the powdered tablets pool.....	108
TABELA 8.1. Degradation rate constant (k), half-life (t _{1/2}) and t ₉₀ for STG coated tablets and STG reference standard in solutions submitted to degradation in HCl 2.5M at 60 °C.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DP1	Produto de degradação com tempo de retenção de 3,4 minutos
DP2	Produto de degradação com tempo de retenção de 5,7 minutos
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
IV	Infravermelho
MS	Espectrometria de massas
K	Constante de velocidade de degradação
R	Coeficiente de correlação
R2	Coeficiente de determinação
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
SQR	Substância química de referência
STG	Sitagliptina
UV	Ultravioleta

RESUMO

Os inibidores da dipeptidil peptidase (DPP-4), também comumente chamados de gliptinas, apresentam-se como uma nova classe de substâncias ativas para o tratamento do diabetes melittus tipo 2. O fosfato de sitagliptina (STG) é o primeiro fármaco desta classe terapêutica que age inibindo a DPP-4, uma enzima que exerce importante papel no controle da glicemia. A literatura pesquisada apresenta poucos estudos sobre a determinação quantitativa e estudos de estabilidade deste fármaco na forma farmacêutica comprimido revestido. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação da sitagliptina em comprimidos revestidos, assim como, realizar o estudo de estabilidade. Análises por calorimetria exploratória de varredura (DSC), determinação da faixa de fusão e espectrofotometria na região do infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear foram realizadas a fim de caracterizar a substância química utilizada como referência neste estudo. Métodos por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do UV, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) foram utilizados para a análise qualitativa do fármaco. A determinação quantitativa da STG foi realizada por CLAE e EC, métodos que foram validados de acordo com os códigos oficiais vigentes. O ensaio de dissolução foi desenvolvido e validado empregando tampão fosfato pH 6,8 e pás a 50 rpm. Nesta etapa do estudo, buscou-se condições de ensaio que favorecessem uma possível correlação com os dados *in-vivo*. Além disso, o trabalho apresenta o estudo da estabilidade da STG com isolamento e identificação de dois produtos de degradação majoritários formados em condições ácidas. A identificação dos produtos de degradação majoritários foi realizada por cromatografia líquida de ultra - performance (UPLC) acoplado à espectrometria de massas (EM).

PALAVRAS-CHAVES: Fosfato de sitagliptina; Cromatografia líquida de alta eficiência; Eletroforese capilar; Ensaio de dissolução; Espectrometria de massas; Estudo da estabilidade.

ABSTRACT

Dipeptidyl peptidase (DPP-4), also commonly called gliptins, presents as a new class of active substances for the treatment of diabetes mellitus type 2. The sitagliptin phosphate (STG) is the first drug in this therapeutic class that acts by inhibiting DPP-4, an enzyme that plays an important role in controlling blood glucose. The literature shows few studies on quantitative determination and stability studies of the drug in dosage form coated tablet. Thus, the objective of this study was to develop and validate analytical methods for the determination of sitagliptin in tablets, as well as, perform the stability study. Analysis by differential scanning calorimetry (DSC), determination of the melting range, infrared spectroscopy (IV), mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (RMN), were carried out to characterize the chemical used as the reference in this study. Methods by thin layer chromatography, UV spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) were used for the qualitative analysis of the drug. Quantitative determination of the STG was performed by HPLC and CE methods that have been validated according to the current official codes. The dissolution test was developed and validated using pH 6.8 phosphate buffer and paddle at 50 rpm. At this stage of the study, was sought test conditions that favored a possible correlation with *in vivo* data. Furthermore, the study shows the stability of STG with isolation and identification of two degradation products majority formed in acidic conditions. Identification of degradation products was performed by a majority of ultra - performance liquid chromatography performance (UPLC) coupled with mass spectrometry (MS).

KEYWORDS: sitagliptin phosphate, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis; dissolution test; mass spectrometry; stability studies

O Diabetes Mellitus (DM) é uma patologia de etiologia múltipla, decorrente da secreção inadequada de insulina ou da incapacidade da mesma em exercer adequadamente sua função (SILVA, 2001). Esta patologia constitui um grave problema de saúde pública, devido a sua alta frequência na população, suas complicações, altos custos financeiros e sociais envolvidos no tratamento e deterioração significativa da qualidade de vida (PERES, 2006).

O DM é uma das principais causas de morbimortalidade em sociedades ocidentais. Sua prevalência aumenta com a idade, embora venha se tornando importante inclusive na adolescência. Apesar de políticas mundiais como “Saúde para Todos” e reformas setoriais dos sistemas de saúde, o diabetes continua a representar um desafio para governos e sociedades, em razão da carga de sofrimento, incapacidade, perda de produtividade e morte prematura que provoca (ROSA e SHIMIDT, 2008).

Cerca de 371 milhões de pessoas no mundo têm diabetes, de acordo com os últimos dados do International Diabetes Federation (IDF), sendo que o DM tipo 2 pode ser cerca de 9 vezes mais comum que o tipo 1 (IDF, 2013). Alguns estudos mais recentes apontam para a presença de 12 milhões de pessoas com diabetes no Brasil, dos quais 50% desconhecem que tem a doença. Em 1988, quando foi publicado o primeiro censo sobre a prevalência no Brasil, este número era de 7 milhões (SBD, 2013).

Os inibidores da dipeptidil peptidase (DPP-4), também comumente chamados gliptinas, apresentam-se como uma nova classe de fármacos, para o tratamento do DM tipo 2 (BARNETT, 2009).

O fosfato de sitagliptina (STG) (Figura 1) é o primeiro fármaco desta nova classe terapêutica que age inibindo a DPP-4, uma enzima que exerce importante papel no diabetes tipo 2, visto que melhora a ação das incretinas. Estes hormônios atuam de modo fisiológico para manter os níveis normais de glicose no sangue, estimulando a produção de insulina pelo pâncreas e diminuindo a produção de glicose pelo fígado (TAHRANI *et al.*, 2010).

A STG, que pode ser administrada apenas uma vez ao dia, aumenta a capacidade do organismo de reduzir os níveis de glicose no sangue (MSD, 2013).

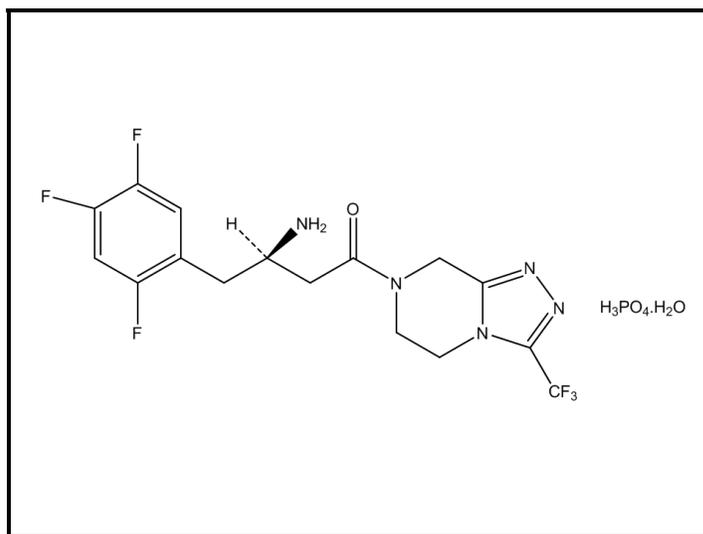


Figura 1.1. Estrutura química do fosfato de sitagliptina

A STG foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA), pelo European Medicines Agency (EMA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2006, para o tratamento do DM do tipo 2 em pacientes que não conseguem atingir o controle glicêmico com dieta e exercício físico (LAMBEIR *et al.*, 2008; ANVISA, 2013).

No Brasil, este fármaco é comercializado com o nome de Januvia[®], sob forma de comprimidos revestidos contendo 25 mg, 50 mg e 100 mg de sitagliptina. O desenvolvimento e a comercialização do produto são de responsabilidade da indústria Merk Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda (MSD, 2013).

Embora haja um número crescente de trabalhos descrevendo a determinação quantitativa da STG em fluidos biológicos e na forma farmacêutica por diversos métodos, este fármaco ainda não possui monografia em nenhuma farmacopéia, nacional e/ou internacional. Face ao exposto, justifica-se desenvolver e validar diferentes métodos, inovadores e exequíveis, para avaliar a qualidade da STG na forma farmacêutica, assim como, estudar a estabilidade dessa substância ativa.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para a caracterização e determinação quantitativa do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos, desenvolver e validar método de dissolução, bem como conduzir estudo de estabilidade para posterior isolamento e elucidação do(s) eventual(is) produto(s) de degradação majoritário(s) formado(s).

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a substância química de referência através das técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H);
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) para identificação da STG na formulação farmacêutica comprimidos revestidos;
- Desenvolver e validar métodos quantitativos para análise da STG na forma farmacêutica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);
- Desenvolver e validar método de dissolução para os comprimidos revestidos contendo fosfato de sitagliptina;
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos;
- Avaliar a estabilidade preliminar da STG frente à hidrólise ácida e básica, oxidação, temperatura e luz;
- Isolar e elucidar o(s) eventual(is) produto(s) de degradação majoritários(s) por técnicas cromatográficas e espectrométricas, respectivamente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos Gerais

Diabetes é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não pode utilizar eficazmente a insulina que foi produzida. Hiperglicemia é um efeito comum da diabetes descontrolada. Ao longo do tempo, o diabetes pode gerar conseqüências graves, levando a danos cardíacos, vasculares, visuais e também renais (WHO, 2013).

Existem dois tipos de diabetes: tipos 1 e 2. No caso do diabetes tipo 1, o paciente é insulino-dependente, isto é, não produz insulina e precisa receber a insulina para manter os níveis adequados de glicose no sangue. No diabetes tipo 2, o mais comum, o paciente produz insulina em quantidades insuficientes e/ou o organismo desenvolve resistência aos efeitos da insulina: o resultado é um déficit relativo de insulina (MSD, 2013). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes, no Brasil, dentre os pacientes que têm diabetes, 90% têm diabetes tipo 2 e 10% têm diabetes tipo 1, seguindo a mesma relação mundial descrita pelo International Diabetes Federation.

Os principais sintomas associados ao diabetes mellitus (DM) tipo 2 são: diurese, perda de peso, sede excessiva, aumento do apetite, cansaço, infecções frequentes, alteração visual (visão embaçada), dificuldade na cicatrização de feridas, formigamento nos pés e furunculose (SBD, 2013).

Embora tipicamente associada com a idade avançada, o DM tipo 2 está sendo diagnosticado também em crianças e adolescentes (ADA, 2013). Sabe-se que esta patologia possui um fator hereditário maior do que a encontrada para o diabetes tipo 1. Além disso, há uma grande relação com a obesidade e o sedentarismo. Estudos mostram que 60 a 90% dos portadores da doença são obesos (SBD, 2013).

Segundo o World Health Report (WHO), até o ano de 2010, mais de 285 milhões de pessoas em todo o mundo viviam com o diabetes (Figura 3.1). Estimativas mostram que o número de casos pode aumentar até 438 milhões, em 2030.

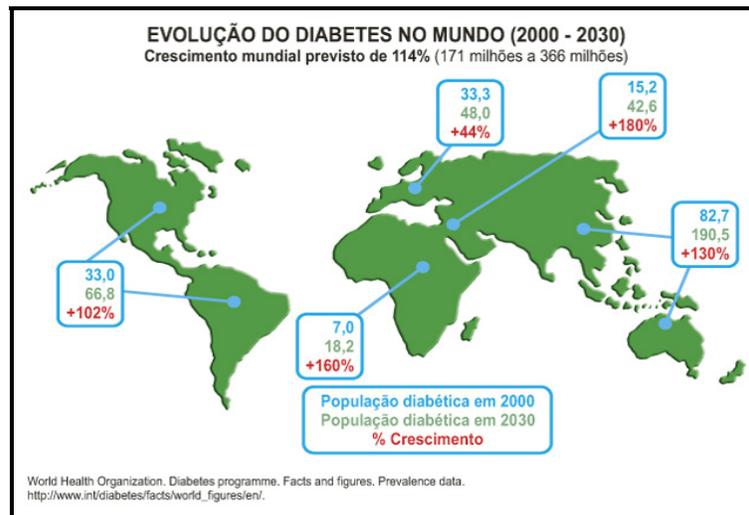


Figura 3.1. Prevalência estimada de diabetes mellitus no mundo (Fonte WHO, 2011).

No tratamento do DM tipo 2 é preciso utilizar medicamentos orais e, dependendo do caso, uma combinação destes com a insulina (SBD, 2013). Várias classes de agentes farmacológicos estão disponíveis para reduzir os níveis de glicose no sangue, e estes fazem uso de diferentes mecanismos de ação.

Os medicamentos orais disponíveis para o controle da glicemia incluem a metformina, do grupo das biguanidas, as sulfoniluréias, metiglinidas, glitazonas, também chamadas tiazolidinedionas e também os inibidores da alfa-glucosidase (BRANCHTEIN e MATOS, 2004). Mais recentemente, novos fármacos surgiram, como é o caso da exenatida, que mimetiza a ação das incretinas intestinais, a pramlintida, que mimetiza a ação da amilina produzida no pâncreas e a sitagliptina, que antagoniza a degradação das incretinas.

Os conhecimentos científicos sobre o diabetes e seu tratamento certamente têm evoluído para patamares cada vez mais esclarecedores. Entretanto, ainda hoje, permanecem desafios que dificultam o manejo dos pacientes com diabetes. Todos esses elementos, aliados ao fato de que ainda não se dispõe do hipoglicemiante ideal, abrem a perspectiva de importantes conquistas terapêuticas com o advento de

novas classes de medicamentos, a exemplo dos inibidores da DPP-4 (ABRAN, 2009; SBD, 2013).

Os inibidores da DPP-4 têm como principais representantes a sitagliptina, saxagliptina, vildagliptina e, mais recentemente, a alogliptina e a linagliptina. Estes fármacos são inibidores competitivos com alta afinidade para a DPP-4. Em humanos, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, eficácia, segurança e tolerabilidade foram avaliados em vários estudos clínicos, no entanto, o banco de dados mais abundante está disponível somente para sitagliptina e vildagliptina (AHREN, 2008; THORNBERRY e GALLWITZ, 2009).

3.2. Atividade Hipoglicemiante

O mecanismo de ação da STG é distinto em relação a outras classes atualmente disponíveis no mercado, tendo vários diferenciais em relação aos conhecidos hipoglicemiantes orais:

- Tem melhor perfil de tolerabilidade, isto é, menos efeitos adversos, tais como, aumento de peso e hipoglicemia (níveis muito baixos de glicose no sangue), um sintoma comum com outros medicamentos para diabetes (MSD, 2013);
- Tem a vantagem de ser um medicamento oral, para administração em dose única diária, que pode ser tomado a qualquer momento do dia e não somente quando os níveis de glicose estão altos (THORNBERRY e GALLWITZ, 2009; MSD, 2013).

3.3. Indicações

A STG é indicada para manter o controle glicêmico em pacientes com DM tipo 2. Ela pode ser utilizada em monoterapia, para pacientes com DM tipo 2 não controlada, ou seja, quando a dieta e o exercício físico isoladamente não são eficazes e a administração de metformina é inapropriada devido a contra-indicações ou intolerância (FDA, 2011).

Em terapêutica oral dupla, quando a STG é associada à metformina. Nesses casos a dieta e o exercício físico, associados à metformina em monoterapia, não proporcionam um adequado controle da glicemia (FDA, 2011).

Em terapêutica oral tripla, a STG é associada com sulfoniluréia e metformina. Nestes casos, a dieta e o exercício físico, associados a uma terapêutica dupla, não proporcionam o adequado controle da glicemia (FDA, 2011).

A STG também está indicada como terapêutica adjuvante à insulina (com ou sem metformina), quando a dieta e o exercício, associados a uma dose estável de insulina, não proporcionam um adequado controle da glicemia (MSD, 2011; FDA, 2011).

3.4. Mecanismo de ação

Os hormônios incretinas, inclusive o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), são liberados pelo intestino ao longo do dia e seus níveis aumentam em resposta a uma refeição. Estima-se que as incretinas contribuem com mais de 70% na resposta da insulina frente a uma administração oral de glicose (AHRE'N, 2008).

Os peptídeos GIP e GLP-1 têm um papel fundamental na regulação da homeostase da glicose. A ativação dos receptores GIP e GLP-1 em células β -pancreáticas leva ao aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e do cálcio intracelular, com subsequente secreção da insulina glicose dependente (DRUCKER e NAUCK, 2006).

O tratamento com GLP-1 ou com inibidores da DPP-4, em modelos animais com DM tipo 2, demonstrou melhorar a responsividade das células β à glicose, estimulando assim a biossíntese e a liberação da insulina. Com níveis de insulina mais altos, a captação tecidual de glicose é aumentada. Além disso, o GLP-1 diminui a secreção de glucagon pelas células α -pancreáticas. A redução das concentrações de glucagon, associada a níveis mais altos de insulina, resulta em redução da produção hepática de glicose e consequente redução da glicemia. Quando as concentrações sanguíneas de glicose estão baixas, não são observadas

estimulação da liberação de insulina e supressão da secreção de glucagon pelo GLP-1 (THORNBERRY e GALLWITZ, 2009).

O GLP-1 e o GIP não impedem a resposta normal do glucagon à hipoglicemia. A atividade do GLP-1 e do GIP é limitada pela enzima DPP-4, que hidrolisa rapidamente os hormônios incretina em produtos inativos. Embora a sitagliptina seja um inibidor potente e altamente seletivo da enzima DPP-4, ela não inibe as enzimas estreitamente relacionadas como a DPP-8 ou DPP-9. A inibição da DPP-8 ou da DPP-9, mas não da DPP-4, está associada à toxicidade nos modelos animais pré-clínicos e à alteração da função imunológica *in vitro* (MSD, 2011; FDA, 2011).

A sitagliptina evita a hidrólise dos hormônios incretina pelo DPP-4, aumentando, conseqüentemente, as concentrações plasmáticas das formas ativas de GLP-1 e GIP. Ao potencializar os níveis de incretina ativa, a sitagliptina aumenta a secreção da insulina e suprime a secreção do glucagon de modo dependente da glicose, para ambas, melhorando o controle glicêmico por reduzir a glicemia somente quando é necessário (Figura 3.2) (MSD, 2011).



Figura 3.2. Mecanismo de ação do fosfato de sitagliptina (Fonte: MERCK SHARP & DOHME; CHARBONNEL *et al.*, 2008).

3.5. Farmacodinâmica e Farmacocinética

O GLP-1, semelhante ao glucagon é uma das incretinas mais estudadas (HOLST, 1999; BAGGIO e DRUCKER, 2002; DEACON, 2007). Quando administrado por via parenteral, ela promove a secreção aguda de insulina (MU *et.*

al., 2009). O efeito farmacológico da STG se dá pela não degradação dos GLP-1 ativos ao invés de um aumento na secreção de GLP-1 (HERMAN *et al.*, 2005; BERGMAN *et al.*, 2006; HERMAN *et al.* 2006).

A biodisponibilidade absoluta da STG após administração oral em voluntários saudáveis é de aproximadamente 87%. A co-administração de uma refeição rica em gorduras com STG não tem qualquer efeito na farmacocinética, desse modo, a STG pode ser administrada com ou sem alimentos. Após a administração de uma dose de 100 mg, a STG é rapidamente absorvida, com picos de concentrações plasmáticas entre 1 a 4 horas, a AUC plasmática média é de 8,52 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, sendo importante considerar que a AUC aumenta proporcionalmente à dose administrada. A concentração máxima encontrada é de 950 nM (dose de 100 mg de STG) e aproximadamente 79% da STG é excretada inalterada na urina (EMEA, 2007).

3.6. Reações adversas

A STG é um novo fármaco hipoglicemiante e embora as pesquisas tenham indicado eficácia e segurança aceitáveis para a comercialização, efeitos indesejáveis e não conhecidos podem ocorrer. A STG foi bem tolerada em estudos clínicos controlados tanto em monoterapia quanto na terapia combinada e a incidência global de eventos adversos foi semelhante à relatada com a utilização de placebo. A incidência global de hipoglicemia e eventos adversos gastrointestinais em pacientes que receberam STG foi semelhante à observada com o placebo, com exceção da incidência mais alta de náuseas com a dose de 200 mg (MSD, 2011).

3.7. Descrição do fármaco

O fosfato de sitagliptina apresenta as seguintes características:

- Descrição: Pó cristalino branco, não higroscópico (FDA, 2011);
- Nome químico: 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) (FDA, 2011);
- Fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}\cdot\text{H}_3\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (FDA, 2011);

- Massa molecular fosfato de sitagliptina: 523,32 (FDA, 2011);
- Faixa de fusão: 159 – 163 °C (obtido experimentalmente);
- Solubilidade: Solúvel em água e N, N-dimetilformamida, pouco solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol, acetona e acetonitrila e insolúvel em isopropanol e acetato isopropílico (MSD, 2011; FDA, 2011);
- pKa: $pka_1 = 1,3$ e $pka_2 = 8,6$ (ACD, 2011).

3.8. Determinação qualitativa e quantitativa

A identificação dos fármacos nos produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade dos mesmos. Várias metodologias e técnicas analíticas podem ser utilizadas na identificação e caracterização de substâncias, sendo escolhidas após avaliar fatores relativos à substância e também ao método empregado.

Em relação às determinações quantitativas, devem ser utilizados métodos analíticos validados. Os órgãos reguladores do Brasil e também de outros países exigem a validação de metodologias analíticas para registro de novos produtos e, para isso, a maioria deles têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Na validação de um método, os parâmetros de desempenho analítico normalmente avaliados são: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez e quando aplicáveis, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003, ICH, 2005a; USP 35, 2012).

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, por meio de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida (BRASIL, 2003).

A necessidade de comprovar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI, 2004).

3.9. Métodos analíticos

3.9.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV)

Devido a sua facilidade, rapidez, custo relativamente baixo e também pela possibilidade de muitos fármacos absorverem nesta região, a espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) é um método amplamente utilizado para a quantificação de fármacos. Muitos solventes estão disponíveis para a análise na região do UV e a escolha do mesmo deve ser baseada na solubilidade da substância a ser analisada (CLURCZAK, 1998).

A literatura pesquisada descreve a determinação da sitagliptina em preparações farmacêuticas por espectrofotometria através de uma reação colorimétrica, na qual, a amina primária da sitagliptina condensa com acetil acetona e formaldeído, produzindo uma solução de cor amarela que pode ser medida em 430 nm (SEKARAN e RANI, 2010). MONILA e colaboradores (2012) publicaram dois métodos espectrofotométricos para a determinação da sitagliptina, o primeiro descreve a complexação da sitagliptina com azul de bromo timol e o segundo com verde de bromo cresol, analisados em 412 e 419 nm, respectivamente.

PATHADE e colaboradores (2011) realizaram a quantificação da sitagliptina, através da validação de um método espectrofotométrico simples, sensível e de baixo custo, analisando a STG em 267 nm.

NYOLA e JEYABALAN (2012) desenvolveram um método para análise da STG e metformina (matéria-prima e produto acabado) por espectrofotometria na região do UV utilizando dois comprimentos de onda (231 nm - metformina e 267 nm - sitagliptina).

3.9.2. Eletroforese capilar (EC)

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação utilizada, principalmente, para análise de compostos ionizados. Sua aplicação permite a determinação quantitativa de fármacos em produtos acabados com elevado potencial de emprego em análises enantiosseletivas (ALTRIA *et al.*, 1998).

As análises por eletroforese capilar estão fundamentadas em mecanismos diversos de separação. Atualmente, os principais modos de separação desenvolvidos são: a eletroforese capilar de zona (CZE), também conhecida como eletroforese em solução livre, a cromatografia capilar eletrocinética micelar (MECK), a eletrocromatografia, a eletroforese capilar em gel, a focalização isoelétrica capilar e a isotacoforese capilar (USP 35, 2012).

Em 2012, LANGE e colaboradores descreveram um método por eletroforese capilar para análise do fosfato de sitagliptina na forma farmacêutica comprimidos revestidos. Por sua vez, SALIM e colaboradores (2012) publicaram a determinação simultânea de sitagliptina e metformina em preparações farmacêuticas por eletroforese capilar de zona com aplicação para análise em plasma humano.

3.9.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Atualmente, a CLAE é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na determinação quantitativa de fármacos. A maioria dos Códigos Oficiais preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens como precisão, exatidão, seletividade e capacidade de automação.

A CLAE é o método quantitativo que apresentou o maior desenvolvimento nos últimos anos, principalmente devido às inovações em colunas e softwares de controle. Por esta razão, é o método de escolha da indústria farmacêutica para a realização do controle de qualidade de seus produtos e é o mais preconizado pelos Códigos Oficiais (WATSON, 2005).

A sitagliptina é um hipoglicemiante oral que foi liberado para uso clínico em 2006 pelo FDA, EMEA e ANVISA. Portanto, este fármaco ainda é relativamente novo e poucos são os estudos que utilizam a CLAE para análise deste. A partir de 2011, foi possível observar um aumento considerável no número de publicações utilizando diferentes métodos analíticos.

Na literatura pesquisada, existem trabalhos que empregam a CLAE para determinação da sitagliptina, tanto em fluidos biológicos, quanto matéria-prima e produto acabado, entre os quais, é possível destacar: NIROGI e colaboradores

(2008) descreveram um método para quantificação da STG em plasma por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; ZENG e colaboradores

(2010) também publicaram um método para determinação da STG em plasma por LC-MS/MS; RAMZIA e colaboradores (2011) realizam a quantificação da STG isolada e em uma mistura ternária (metformina, sitagliptina e produto de degradação da sitagliptina). Em 2012, LANGE e colaboradores e também RAVANELLO e colaboradores publicaram métodos indicativos de estabilidade por LC-UV para determinação da STG em comprimidos revestidos.

Conforme foi demonstrado, o número de trabalhos descrevendo análises quantitativas da STG, tanto em fluidos biológicos, como no produto acabado, vem crescendo consideravelmente. Recentemente, com o surgimento de novas associações, como, por exemplo, sitagliptina e metformina ou sitagliptina e sinvastatina, as oportunidades para novos estudos também aumentam. Consequentemente, é possível destacar dois trabalhos: um publicado por SHARMA e colaboradores (2012), os quais desenvolveram e validaram um método por CLAE para determinação da sitagliptina e sinvastatina em formulações farmacêuticas e outro descrito por MALLESWARARAO e colaboradores (2012) que também desenvolveram um método por CLAE para análise simultânea da sitagliptina e metformina em comprimidos revestidos.

3.10. Ensaio de dissolução

A dissolução de medicamentos pode ser definida como fenômeno em que um fármaco no estado sólido se libera de sua forma farmacêutica de administração e entra em solução. Para medicamentos de administração oral, os parâmetros fundamentais que controlam a taxa e a extensão da absorção são a sua solubilidade aquosa e sua permeabilidade gastrointestinal (AMIDON *et al.*, 1995; KASIM *et al.*, 2003).

Os estudos de dissolução constituem um dos elementos essenciais para avaliar e garantir as propriedades biofarmacotécnicas das formulações. RAVANELLO e colaboradores (2010) publicaram um estudo descrevendo a avaliação do perfil de dissolução da STG com quantificação da porcentagem

dissolvida por espectrofotometria na região do UV. Entretanto, não há trabalhos relatando o desenvolvimento e validação do método de dissolução dos comprimidos revestidos de STG visando uma possível correlação entre os dados *in vivo* - *in vitro*.

O FDA apresenta as condições para o ensaio de dissolução que foram utilizadas para o registro do produto, sem indicação do método empregado para a quantificação.

Face à dose, à solubilidade e à permeabilidade, os fármacos podem ser classificados como pertencentes às seguintes categorias no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (AMIDON *et al.*, 1995; BRASIL, 2010; LINDENBERG *et al.*, 2004):

- Classe I: alta solubilidade (AS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe II: baixa solubilidade (BS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe III: alta solubilidade (AS) e baixa permeabilidade (BP);
- Classe IV: baixa solubilidade (BS) e baixa permeabilidade (BP).

Apesar de não ter sido encontrada a classificação biofarmacêutica da STG, pode-se inferir que o fármaco seja de classe I, visto que apresenta alta solubilidade e biodisponibilidade de 87%.

3.11. Estabilidade - Isolamento e identificação de produtos de degradação

O propósito do estudo de estabilidade é prover evidência de como a estrutura de um fármaco varia com o tempo, sob influência de uma variedade de fatores, e estabelecer um período de re-teste para a substância ou a vida de prateleira do produto, recomendando as condições de estocagem (ICH, 2003). A validade pode também, ser definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual a especialidade farmacêutica, ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente, mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (BRASIL, 2005).

O desenvolvimento dos ensaios de estabilidade exige uma pesquisa ampla em torno dos procedimentos utilizados e um conhecimento teórico das reações de degradação e dos princípios de cinética química, afinal, sabe-se que as reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química, podendo ser aceleradas através do aumento da temperatura (NUDELMAN, 1975).

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

A literatura pesquisada descreve o estudo da estabilidade da sitagliptina em meio básico (NaOH 2,5 M), com posterior isolamento e identificação do produto de degradação por técnicas de IV, RMN e MS (EL-BAGARY *et al.*, 2011).

**4. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE
REFERÊNCIA (SQR) FOSFATO DE SITAGLIPTINA**

4.1. Introdução

A pureza das substâncias de referência tem importância fundamental na validação de métodos analíticos. Existem duas categorias de substâncias de referência descritas pelo FDA: compendiais e não-compendiais.

As substâncias de referência compendiais são aquelas adquiridas comercialmente de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior. As substâncias de referência não-compendiais são aquelas com elevado teor de pureza, entretanto, necessitam ser cuidadosamente caracterizadas (SWARTZ e KRULL, 1998). Face ao exposto, buscou-se caracterizar a substância química que foi utilizada como referência neste trabalho.

A análise espectrofotométrica no infravermelho (IV) é um dos métodos mais empregados para a identificação de fármacos. Através da análise de um espectro obtido no infravermelho é possível visualizar as bandas características de grupos funcionais que permitem a obtenção de informações estruturais úteis para a identificação de substâncias (CIENFUGOS e VAISTMAN, 2000). A análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC) que permite avaliar as propriedades físico-químicas das substâncias em função da temperatura, podendo indicar a pureza de fármacos, apresenta-se como uma técnica muito sensível e adequada ao objetivo pretendido (USP 35, 2012).

A ressonância magnética nuclear também fornece informações estruturais importantes para a caracterização e identificação de moléculas, enquanto que a espectrometria de massas permite a identificação pela massa do íon molecular e seus fragmentos.

4.2. Fosfato de sitagliptina – SQR

A substância química caracterizada e empregada como referência neste trabalho foi o fosfato de sitagliptina, com teor declarado de 99,5%, adquirida pela Sequoia Research Products (Oxford, UK), conforme especificado no certificado de análise.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Caracterização da SQR fosfato de STG

Para a caracterização da substância química utilizada como referência, diferentes técnicas foram empregadas, dentre elas: análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC), ponto de fusão, espectrofotometria na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN ^1H).

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, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N_2) 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 da SQR fosfato de STG para porta-amostra de alumínio, a qual 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 4.1 está representada a rampa de aquecimento obtida por DSC para a SQR fosfato de STG.

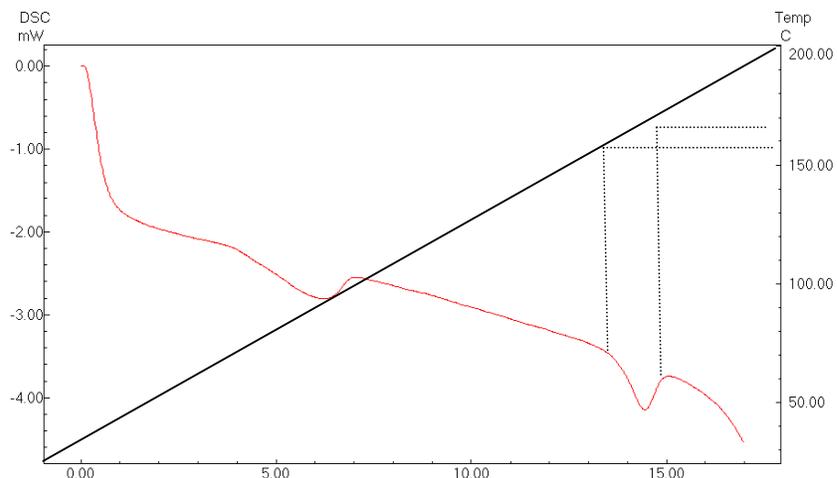


Figura 4.1. Curva de DSC da SQR fosfato de sitagliptina, obtida em fluxo de nitrogênio e rampa de aquecimento.

A faixa de fusão da STG, segundo o termograma obtido, apresentou valor de 160,84 °C a 171,05 °C, mostrou-se bastante ampla quando comparada com os valores obtidos em outras técnicas. Este fato pode estar relacionado a uma provável decomposição da amostra durante a fusão (MATHKAR *et al.*, 2009).

4.3.1.2. Determinação da faixa e do ponto de fusão

A análise da faixa de fusão da SQR fosfato de sitagliptina foi avaliada pelo equipamento tipo Koffler, marca Wagner & Muniz. Foi transferida uma pequena quantidade da SQR para uma lâmina de vidro e após colocou-se uma lamínula sobre a amostra. A lâmina sofreu um aquecimento gradual e foi possível observar a fusão da amostra pelo microscópio acoplado a chapa de aquecimento, permitindo o registro da temperatura inicial e final da fusão.

O ponto de fusão foi determinado em equipamento Mettler Toledo, FP 90, previamente calibrado, que emprega um método automático para determinação do ponto de fusão. A SQR fosfato de sitagliptina foi compactada em um tubo capilar (1mm x 6cm) e o aquecimento foi de 5 °C/minuto. Este equipamento opera da seguinte maneira: os capilares são iluminados por uma fonte de luz e fotossensores convertem a luz residual transmitida em um sinal elétrico proporcional. O ponto de fusão é determinado no momento em que os cristais da amostra coalescem,

originando um fluido transparente que possibilita a leitura pela passagem da luz através do tubo capilar.

4.3.1.2.1. Resultados e Discussão

A análise realizada em triplicata no equipamento tipo Koffler forneceu uma faixa média de fusão de 159 - 163 °C. A temperatura foi medida por um termômetro acoplado à chapa de aquecimento.

Os valores de ponto de fusão obtidos pelo equipamento Mettler Toledo foram os seguintes: $n_1=159,1$ °C; $n_2=162,8$ °C e $n_3= 160,3$ °C. Este equipamento permite também que seja programada a determinação automática da faixa de fusão, no entanto, mesmo selecionando esta opção e repetindo a análise duas vezes, foi obtido somente o valor do ponto de fusão. Este fato pode estar ligado à granulometria da amostra e sua compactação no capilar ou, até mesmo, a uma possível decomposição que possa estar ocorrendo.

Na literatura, não foram encontrados dados sobre a faixa de fusão da STG, ressaltando assim, a importância da análise. Após a fusão, a SQR fosfato de sitagliptina sofreu uma leve alteração na coloração, passando de branco para amarelo claro, visível após a retirada da amostra nos dois métodos propostos.

Desse modo, os resultados obtidos pelo equipamento tipo Koffler e pelo equipamento Mettler Toledo foram semelhantes, indicando que esta técnica pode ser utilizada para auxiliar a identificação da SQR em questão.

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

O espectro na região do infravermelho do fosfato de sitagliptina SQR foi obtido em espectrômetro infravermelho FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX. As análises realizadas neste equipamento não necessitam da formação da pastilha de KBr, visto que, a amostra é introduzida diretamente no mesmo.

4.3.1.3.1. Resultados e discussão

Na Figura 4.2 é possível observar o espectro de absorção na região do infravermelho do fosfato de sitagliptina SQR.

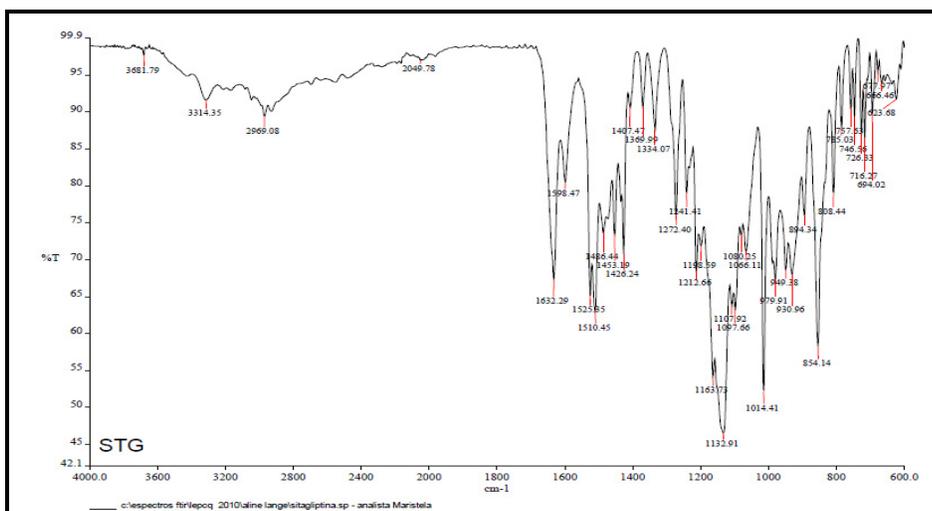


Figura 4.2. Espectro de absorção na região do infravermelho do fosfato de STG SQR.

A análise espectrofotométrica na região do infravermelho é uma das técnicas mais empregadas para a identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção de isômeros ópticos (CIENFUGOS e VAITSMAN, 2000).

A identificação de bandas características da STG foi realizada com base na literatura (NAKANISHI, 1977; SILVERSTEIN e WEBSTER, 2007; PAVIA *et al.*, 2009). A indicação das principais bandas do espectro de absorção na região do IV estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção do fosfato de sitagliptina e suas respectivas atribuições.

Frequência (cm^{-1})	Atribuição
3300 – 3350	Deformação axial de N-H
3017 e 2960	Deformação axial de C-H
1600 – 1400	Estiramento da ligação C=C de fenila
1650 – 1600	Deformação axial C=O da amida
900 – 675	Deformação angular fora do plano de C-H
785 – 765	Substituição em <i>orto</i> de fenila
860 – 800	Substituição em <i>para</i> de fenila

As bandas encontradas estão de acordo com as atribuições esperadas para a SQR fosfato de sitagliptina.

4.3.1.4. Espectrometria de massas

O espectro de massas foi obtido por UPLC-UV/MS, no equipamento Waters® Acquity e espectrômetro de massas Micromass Q-ToF. A detecção do fármaco foi realizada por detector com interface de ionização por *eletrospray*, operado no modo positivo (ESI^+).

4.3.1.4.1. Resultados e discussão

O espectro de massas da SQR fosfato de sitagliptina está representado na figura 4.3.

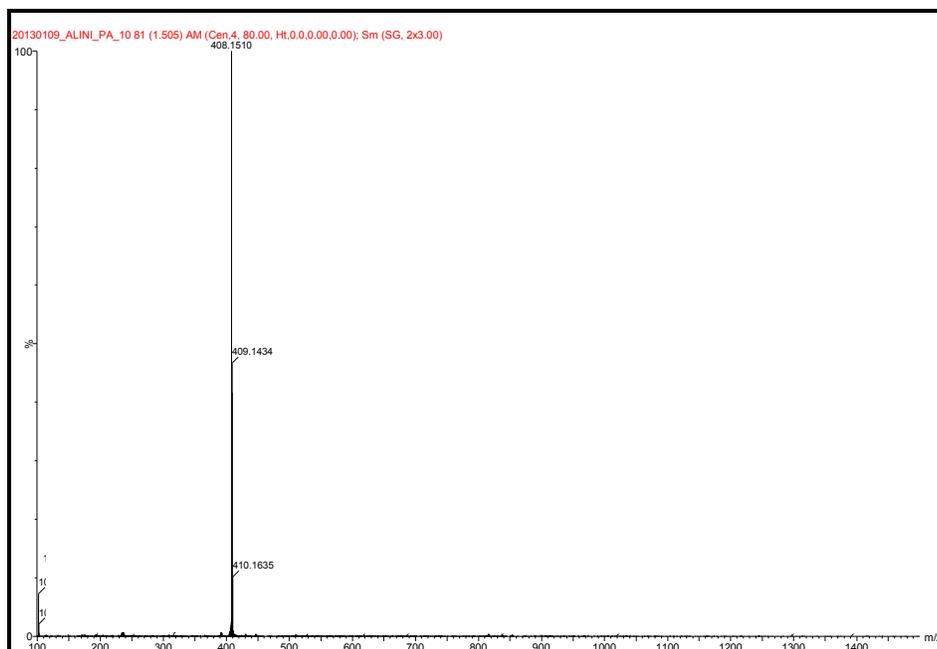


Figura 4.3. Espectro de massas do fosfato de sitagliptina SQR.

O espectro de massas da SQR fosfato de sitagliptina apresenta um íon molecular de m/z 408,15, de acordo com o esperado para o fosfato de sitagliptina.

4.3.1.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

A ressonância magnética nuclear é uma importante técnica para caracterização da exata estrutura de matérias-primas e produtos acabados e fornece mais informações sobre a estrutura molecular do que qualquer outra técnica. A determinação de impurezas, incluindo impurezas enantioméricas, pode ser avaliada sem prévia separação até níveis de aproximadamente 10%. Além disso, possui bom potencial para análise de formulações farmacêuticas sem prévia preparação e o espectro de misturas pode servir como referência (“impressão digital”) (WATSON, 2005).

As análises foram realizadas em espectrômetro de 300 MHz. A substância fosfato de sitagliptina foi solubilizada em metanol deuterado para obtenção dos espectros de RMN ^1H .

A Figura 4.4 apresenta o espectro de RMN ^1H e a relação dos deslocamentos químicos observados com a estrutura do fosfato de sitagliptina. A Tabela 4.3 resume e caracteriza os dados do espectro.

4.3.1.5.1. Resultados e discussão

As atribuições do espectro de RMN ^1H , bem como a estrutura química do fosfato de sitagliptina, estão apresentadas na Figura 4.4 e na Tabela 4.2, respectivamente.

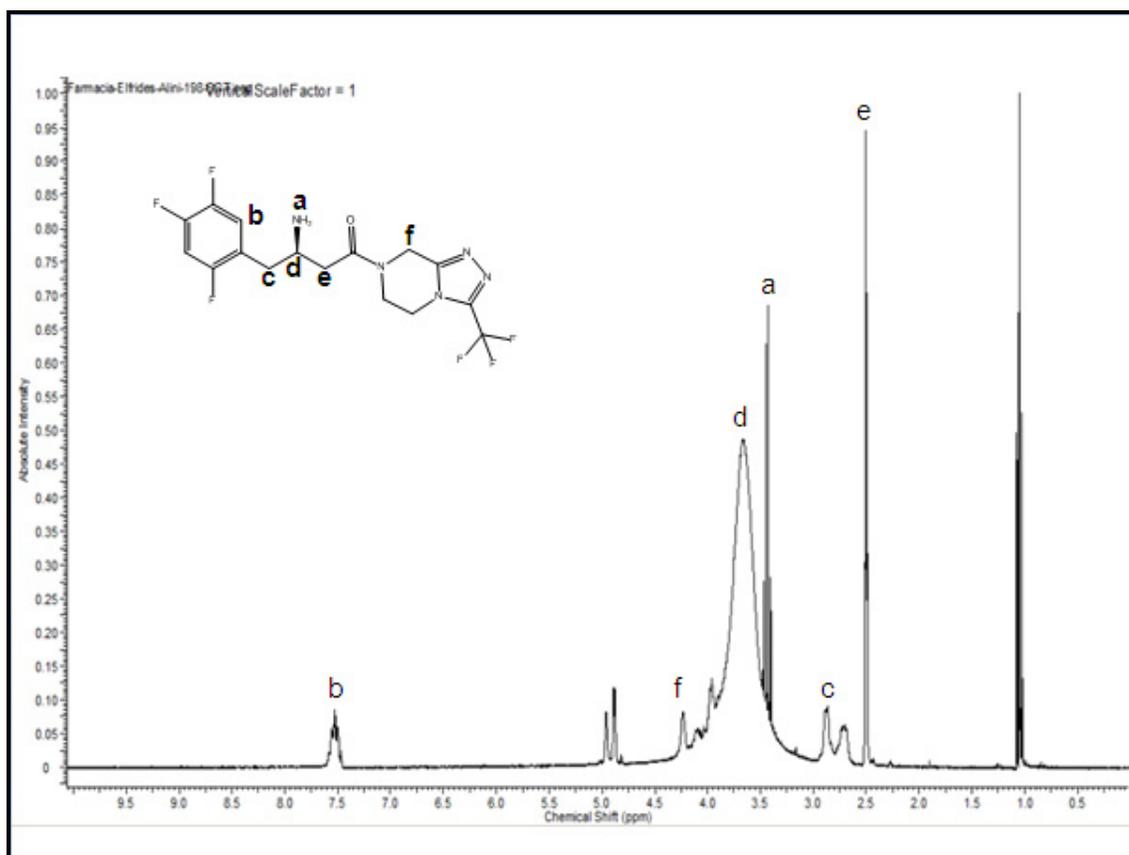


Figura 4.4. Espectro de RMN ^1H em metanol deuterado do fosfato de sitagliptina SQR.

TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ^1H para o fosfato de sitagliptina SQR em metanol deuterado (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Deslocamento químico (PPM)	Integração	Atribuição
3,29 (a)	2H	NH ₂
7,30 (b)	2H	CH
2,83 (c)	2H	CH ₂
3,70 (d)	1H	CH
2,45 (e)	2H	CH ₂
4,35 (f)	6H	CH ₂

Desse modo, a análise dos resultados obtidos nos ensaios de RMN ^1H para o fosfato de sitagliptina permitiu a identificação da SQR pela interpretação dos principais deslocamentos químicos da molécula.

4.4. Conclusões

- Na análise por DSC, a faixa de fusão encontrada apresenta-se mais ampla, de 160,84 - 171,05 °C, entretanto, o valor do ponto de fusão (160,84 °C) assemelha-se aos determinados utilizando equipamentos de fusão tipo Koffler e Mettler Toledo;
- As técnicas para determinação da faixa e do ponto de fusão do fosfato de sitagliptina SQR, utilizando o microscópio de ponto de fusão tipo Koffler e o equipamento Mettler Toledo, respectivamente, apresentaram valores muito próximos, entre 159 - 163 °C;
- Na análise por IV pode-se observar bandas características do fosfato de sitagliptina, as quais fornecem informações estruturais essenciais para assegurar a identidade da SQR;
- A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação do fosfato de sitagliptina através da verificação da sua massa molecular;
- A interpretação dos espectros de RMN-¹H demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de fosfato de sitagliptina;
- A partir dos resultados obtidos, caracterizou-se a substância química fosfato de sitagliptina, a qual será utilizada como SQR nos estudos propostos nesta Tese.

**5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DO FOSFATO DE SITAGLIPTINA EM
COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

5.1. Introdução

Técnicas cromatográficas e espectrofotométricas são amplamente utilizadas para a identificação de fármacos em produtos acabados. Cada técnica tem suas vantagens e limitações. Cabe ao analista avaliar qual delas melhor se enquadra com a disponibilidade de amostra, o tempo de análise e os equipamentos disponíveis no laboratório.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das técnicas de mais fácil execução e compreensão. É rotineiramente utilizada em diversas análises. É considerada uma técnica de baixo custo quando comparada às demais técnicas analíticas. A CCD tem várias utilidades, como: identificação de compostos idênticos, determinação do número de componentes em uma amostra e, também, pode ser aplicada para o monitoramento da separação de uma mistura em uma coluna cromatográfica.

A absorção da radiação ultravioleta por muitos compostos ocorre numa faixa muito reduzida de comprimento de onda. Em decorrência disto, a absorção UV fornece menos possibilidades para identificação de grupos funcionais do que outras técnicas espectroscópicas, como o infravermelho e a ressonância magnética nuclear (CIENFUGOS e VAITSMAN, 2000). A identificação de fármacos por UV e VIS é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Desse modo, é possível verificar se os produtos apresentam os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção (WATSON, 2005).

A identificação de fármacos por CLAE é avaliada pela similaridade entre os valores de tempo de retenção obtidos para a solução amostra e para a solução padrão. Tempos de retenção idênticos sugerem a mesma identidade entre as amostras, assim como, a semelhança entre os cromatogramas. Essas relações comprovam a presença do fármaco nas amostras e também a eficiência do sistema cromatográfico na identificação da amostra analisada.

A análise qualitativa por eletroforese capilar (EC) fornece dados sobre a identidade de um pico no eletroferograma através da comparação do tempo de

migração ou mobilidade eletroforética de um pico com dados experimentais obtidos de um composto conhecido (KUHN e HOFFSTETTER-KUHN, 1993). Assim, tempos de migração e perfil eletroforético semelhantes, sugerem a mesma identidade entre as amostras analisadas.

5.2. Produto Farmacêutico

Em todas as análises foram empregados comprimidos revestidos de STG, contendo 50 mg de sitagliptina base, comercialmente conhecidos por Janúvia[®], fabricados pela Merck Sharp Dohme Ltda e adquiridos no comércio local.

Os excipientes presentes na formulação são: celulose microcristalina, fosfato de cálcio dibásico anidro, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, estearil fumarato de sódio, álcool polivinílico, polietilenoglicol (macrogol), talco, dióxido de titânio, óxido de ferro vermelho e óxido de ferro amarelo.

5.3. Parte Experimental

5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

5.3.1.1. Condições cromatográficas

As soluções da SQR fosfato de STG e dos comprimidos revestidos triturados foram preparadas em metanol na concentração de 1,0 mg/mL. A solução amostra foi mantida em ultrassom durante 30 minutos e, após este período, foi agitada em um agitador mecânico pelos próximos 30 minutos. A solução amostra foi filtrada em papel filtro, desprezando as primeiras alíquotas e, posteriormente, utilizada na cromatografia em camada delgada.

A glibenclamida foi empregada para avaliar a especificidade do método proposto. A solução de glibenclamida foi preparada em metanol na concentração de 1,0 mg/ml.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasas aluminizadas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck) com 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada absorvente. As amostras foram aplicadas na placa aluminizada e esta foi transferida para uma cuba contendo o sistema eluente

constituído de uma mistura de metanol:acetonitrila:triethylamina (90:8:2 v/v/v). Após a corrida cromatográfica as manchas foram visualizadas pela exposição da placa à lâmpada de UV-254 nm.

5.3.1.2. Resultados e discussão

Na análise por cromatografia em camada delgada a fase móvel utilizada foi constituída de metanol:acetonitrila:triethylamina (90:8:2), permitindo a identificação do fosfato de sitagliptina na amostra dos comprimidos revestidos.

Os valores de fator de retenção (R_f) obtidos para as soluções SQR e dos comprimidos revestidos foi de 0,51. O R_f para a solução de glibenclamida foi de 0,83. O R_x obtido entre o R_f da STG e o R_f da glibenclamida foi de 0,61. Na Figura 5.1 pode-se observar o cromatograma obtido por CCD para a análise qualitativa do fosfato de STG na formulação farmacêutica.

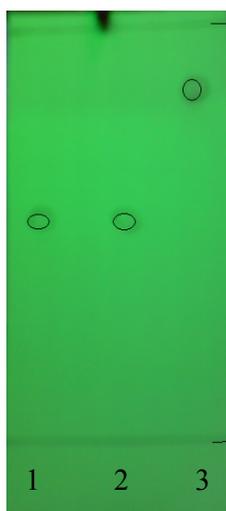


Figura 5.1. Cromatograma obtido por CCD para a SQR fosfato de sitagliptina (1), para a STG comprimidos revestidos (2) e para a glibenclamida (3) revelados por luz UV-254nm.

Os resultados comprovam que é possível realizar a identificação das amostras de STG comprimidos revestidos por CCD, devido à semelhança dos valores de R_f obtidos. A similaridade entre os valores de R_f é um indicativo da presença do fármaco nas amostras, comprovando assim, a eficiência do sistema cromatográfico utilizado para a identificação do hipoglicemiante em estudo.

5.3.2. Espectrofotometria na região do UV

5.3.2.1. Condições espectrofotométricas

Para realizar a análise qualitativa do fosfato de STG nos comprimidos revestidos foi traçado um espectro de absorção molecular na região de 400-200nm da SQR fosfato de STG e dos comprimidos revestidos. As amostras foram preparadas em metanol na concentração de 1,0 mg/ml e após foram diluídas com água para a concentração de 50,0 µg/ml.

As análises por espectrofotometria na região do UV foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A. Os espectros obtidos foram sobrepostos e comparados quanto ao perfil característico da SQR fosfato de STG.

5.3.2.2 Resultados e discussão

Inicialmente, testou-se diversos solventes para realizar a análise espectrofotométrica da STG. Soluções de HCl 0,1M, metanol, água, etanol, acetonitrila e uma mistura de água:metanol (50:50) foram utilizadas nas análises preliminares. No entanto, quando o HCl 0,1M, a água, o etanol, a acetonitrila e a mistura de água:metanol foram utilizados, observou-se uma redução na intensidade da absorção da solução amostra, provavelmente, pelo fato destes solventes não possibilitarem a correta e total extração do fosfato de STG dos comprimidos revestidos.

O solvente de escolha da primeira diluição foi então o metanol por não observar diferença significativa nas absorvâncias da SQR e da solução dos comprimidos revestidos. Optou-se por fazer a segunda diluição em água para reduzir o custo da análise e minimizar a interferência do metanol no sistema. A correção da linha de base foi realizada na faixa de 400-200 nm com uma solução composta por H₂O: metanol (95:5) (v/v). O comprimento de onda de máxima absorção foi 207 nm.

É possível verificar a sobreposição dos espectros das soluções de fosfato de STG SQR e das amostras dos comprimidos revestidos, na concentração de 50 µg/ml, na Figura 5.2.

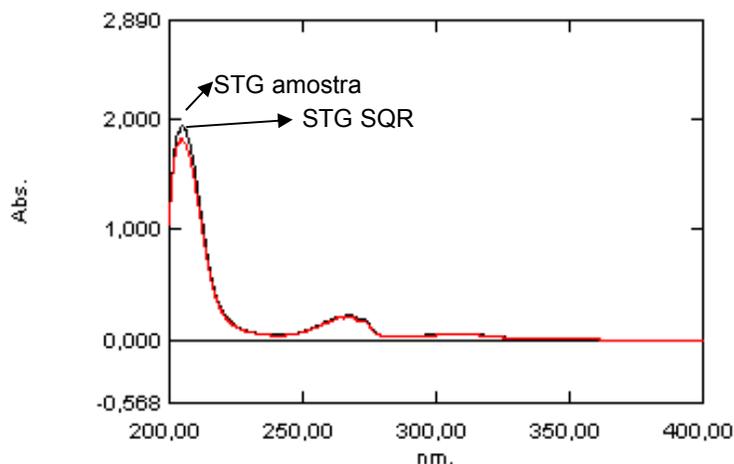


Figura 5.2. Sobreposição dos espectros de absorção na região do UV do fosfato de sitagliptina SQR e dos comprimidos revestidos.

5.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.3.3.1. Condições cromatográficas

Todos os experimentos por cromatografia líquida foram realizados utilizando um cromatógrafo Shimadzu 20-A, equipado com sistema controlador CBM-20A, bombas de fluxo LC-20AT, injetor automático SIL-20A/C, forno e detector PDA. O programa *LC-Solution* foi utilizado para o controle e aquisição dos dados. As condições cromatográficas para a identificação e a quantificação da STG em comprimidos revestidos estão descritas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Condições cromatográficas empregadas para a análise qualitativa e quantitativa do fosfato de sitagliptina por CLAE.

<i>Parâmetro</i>	<i>Descrição</i>
Coluna	Waters X-Bridge™ C ₈ (250 mm x 5 µm)
Temperatura	25 °C
Fase móvel	Solução de trietilamina 0,3% (pH 4,0): acetonitrila (75:25 v/v)
Vazão	1,0 ml/min
Detecção	207 nm
Volume injeção	20 µL

A fase móvel foi preparada a partir de uma solução de trietilamina 0,3 %, pH ajustado a 4,0 com ácido fosfórico 10% e acetonitrila, na proporção de 75:25 (v/v), respectivamente.

As soluções empregadas na análise foram preparadas na concentração de 1,0 mg/ml em metanol. Para a análise qualitativa, as amostras dos comprimidos revestidos e da SQR foram diluídas com fase móvel até uma concentração de 100,0 µg/ml. As amostras dos comprimidos revestidos e da SQR foram filtradas com membrana de nylon de 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo.

5.3.3.2. Resultados e discussão

Na Figura 5.3 os cromatogramas sobrepostos da SQR fosfato de sitagliptina e da solução amostra dos comprimidos revestidos podem ser observados.

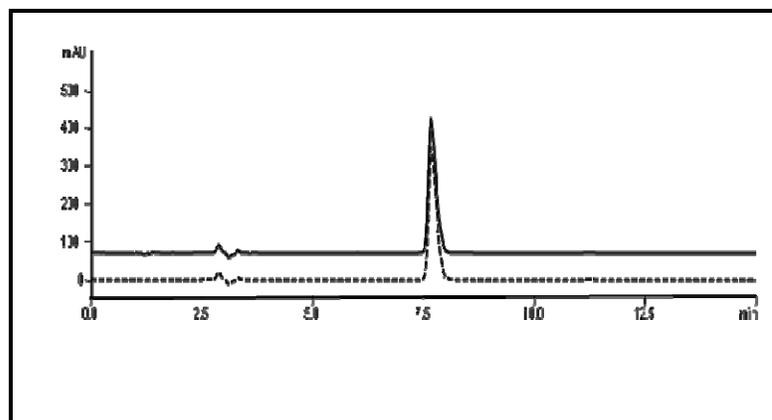


Figura 5.3. Sobreposição dos cromatogramas obtidos da SQR fosfato de sitagliptina (—) e dos comprimidos revestidos de fosfato de sitagliptina (---) na concentração de 100 µg/ml.

Com base na semelhança entre os tempos de retenção e os perfis cromatográficos da solução SQR e comprimidos revestidos é possível afirmar que o método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência é adequado para a identificação da STG nos comprimidos revestidos.

5.3.4. Eletroforese Capilar (EC)

5.3.4.1. Condições eletroforéticas

A análise da STG por eletroforese capilar ocorreu em um sistema de eletroforese capilar Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies) equipado com injetor automático, DAD e controlador de temperatura. O software *CE ChemStation* foi utilizado para controle do sistema, aquisição e tratamento dos dados.

Para a análise qualitativa e quantitativa da STG nos comprimidos revestidos foi empregado o modo de separação por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). A técnica desenvolvida necessitou do uso de um padrão interno para corrigir possíveis diferenças nos volumes de injeção, o padrão interno escolhido foi a duloxetina na concentração de 30 µg/mL. As condições eletroforéticas empregadas estão apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Condições eletroforéticas empregadas na análise qualitativa e quantitativa do fosfato de sitagliptina por eletroforese capilar (MECK).

Característica	Descrição
Capilar de sílica fundida	40,0 cm comprimento (efetivo)
Eletrólito	Tampão TRIS:SDS (50 mM : 75 mM) pH 10,6
Tensão aplicada	30 KV
Comprimento de onda	207 nm
Injeção hidrodinâmica	50 mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Ativação capilar	20 minutos NaOH 0,1M
Pré-condicionamento	NaOH 0,1M, água e eletrólito (2, 1,5 e 1,5 minutos)
Temperatura de análise	25 °C ± 1 °C

O eletrólito de corrida foi constituído por uma mistura de tampão ((hidroximetil)aminometano) (TRIS) 50 mM, pH ajustado para 10,6, com o tensoativo dodecilsulfato de sódio (SDS) 75 mM.

A ativação do capilar ocorreu com solução hidróxido de sódio 1M, água ultrapura e eletrólito durante (30, 15 e 15 minutos), respectivamente. Antes de cada injeção, foi realizado um pré-condicionamento utilizando NaOH 0,1M, água e eletrólito durante 2, 1,5 e 1,5 minutos, respectivamente.

5.3.4.2. Resultados e discussão

Na Figura 5.4 é possível observar os eletroferogramas da SQR fosfato de sitagliptina e dos comprimidos revestidos. Os eletroferogramas foram sobrepostos e deslocados para facilitar a visualização.

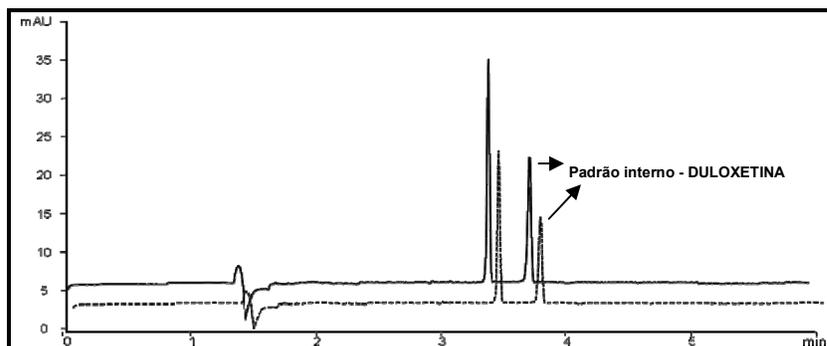


Figura 5.4. Sobreposição e deslocamento dos eletroferogramas da SQR fosfato de STG (—) e STG comprimidos revestidos (---).

Assim como na análise por CLAE, a identificação é confirmada pela similaridade entre os tempos de migração e a semelhança dos eletroferogramas. Desse modo, o método por MECK demonstra ser adequado para a análise qualitativa do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos.

5.4. Conclusões

- O método desenvolvido por cromatografia em camada delgada mostrou-se adequado para a identificação da sitagliptina no produto farmacêutico.
- As sobreposições dos espectros na região do UV, confirmando os valores máximos e mínimos de absorção, permitiram a identificação da STG, assegurando a presença do fármaco nos comprimidos revestidos;
- As técnicas desenvolvidas por CLAE e EC demonstraram que a SQR fosfato de sitagliptina e as amostras dos comprimidos revestidos, apresentam o mesmo valor de tempo de retenção e migração, respectivamente. A semelhança entre os cromatogramas e eletroferogramas obtidos reforçam a viabilidade destas técnicas na identificação do fármaco no produto farmacêutico.

**6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO FOSFATO DE
SITAGLIPTINA EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

6.1. Introdução

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida (BRASIL, 2003).

A análise de fármacos é necessária nas diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como, estudos de formulação e estabilidade, controle de qualidade e em testes farmacológicos e toxicológicos realizados em animais e humanos. A falta de métodos confiáveis de avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (MEHTA, 1997; SWARTZ e KRULL, 1998).

A fim de garantir a credibilidade dos métodos analíticos é imprescindível a sua validação. Regulamentações nacionais, como a RE 899 (BRASIL, 2003), e internacionais, como a International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use – ICH (2006a) e a USP 35 (2012) são guias que contém diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos, indicando os principais parâmetros a serem avaliados na validação de um método.

A USP 35 (2012) e o ICH (2006b) reconhecem a não necessidade da avaliação de todos os parâmetros analíticos para a validação de um método. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais serão os parâmetros a serem investigados (SWARTZ e KRULL, 1998). É responsabilidade do analista identificar os parâmetros que são relevantes para o desempenho do processo analítico (ERMER, 2001).

Os métodos cromatográficos são normalmente utilizados em laboratórios de análise para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas (SWARTZ e KRULL, 1998).

A técnica por CLAE é um método de larga utilização em razão da sua versatilidade, possibilitando a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação e até produtos de degradação ou síntese, através da adequada escolha de condições, tais como, coluna, fase móvel e método de detecção.

A eletroforese capilar também se apresenta como uma técnica muito promissora e eficiente e que vem sendo utilizada cada vez mais na análise de produtos farmacêuticos. Sua aplicação pode ser voltada para um grande número de amostras, incluindo separação de componentes quirais, doseamento, determinação de impurezas e substâncias relacionadas. O uso da EC apresenta algumas vantagens em relação à CLAE, tais como, elevada eficiência, alta resolução, rapidez no desenvolvimento dos métodos, reduzido consumo de solvente e menor volume de amostra utilizada e resíduo gerado (ALTRIA *et al.*, 1998).

A determinação quantitativa do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos foi realizada por CLAE e EC. A comparação estatística entre os métodos propostos foi avaliada através do teste *t-student*.

**6.2. 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.

**6.3. 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
FORMED BY UV-C LIGHT**

Current Pharmaceutical Analysis, v. 8, 360-369, 2012.

**7. CAPÍTULO IV – ENSAIO DE DISSOLUÇÃO PARA OS COMPRIMIDOS
DE FOSFATO DE SITAGLIPTINA**

7.1. INTRODUÇÃO

O teste de dissolução é apontado como uma importante ferramenta para a caracterização de um produto na área farmacêutica. O ensaio de dissolução fornece informações úteis tanto na pesquisa e desenvolvimento, como na produção e controle de qualidade de formas farmacêuticas (MARQUES e BROWN, 2002).

A dissolução é um ensaio cuja importância para a indústria farmacêutica vem sendo cada vez mais reconhecida. É aplicável tanto na pesquisa e desenvolvimento de produtos, como no controle de qualidade de rotina (MARQUES E BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003). Este ensaio surgiu como uma valiosa ferramenta no controle de qualidade para avaliar o desempenho da liberação do produto lote-a-lote e para assegurar a disponibilidade fisiológica do fármaco (SHAH *et al.*, 1995).

O percentual de dissolução pode ser influenciado por diversos fatores, dentre os quais o processo de fabricação da forma farmacêutica, os tipos e quantidades de excipientes utilizados, o teor de água e as propriedades físico-químicas do fármaco (SKOUG *et al.*, 1997). A seleção criteriosa das condições de ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminativo, resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos e distinguir mudanças significativas na composição ou no processo de produção (MANADAS *et al.*, 2002; USP 35, 2012).

A correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) é esperada quando a dissolução é a etapa limitante da absorção do fármaco na circulação, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução é a etapa limitante da absorção (Classe II), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV. O Sistema de Classificação Biofarmacêutico, baseado nestes conceitos, divide as drogas em quatro categorias: Classe I, II, III e IV. O uso da classificação biofarmacêutica determina se há ou não possibilidade de CIVIV (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000). Conforme anteriormente relatado, a literatura pesquisada não apresenta a descrição completa da validação do teste de dissolução e estudos de CIVIV para comprimidos de STG. Diante disso, justifica-se o desenvolvimento e validação de um teste de dissolução a partir de dados de absorção *in vivo* obtidos da literatura para comprimidos do fármaco.

7.2. SITAGLIPTIN PHOSPHATE: DEVELOPMENT OF A DISSOLUTION METHOD FOR COATED TABLETS BASED ON *IN VIVO* DATA FOR IMPROVING MEDIUM SENSITIVITY

Artigo submetido ao periódico DISSOLUTION TECHNOLOGIES

8. CAPÍTULO V – ESTUDO DA ESTABILIDADE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIOS OBTIDOS

8.1. INTRODUÇÃO

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação, em uma determinada embalagem, de manter suas características físicas, químicas, microbiológica, terapêuticas e toxicológicas. Em geral, a perda da estabilidade de um produto afeta sua eficácia, segurança e aceitabilidade pelo paciente. A perda da potência é considerado o efeito mais importante, sendo 90% do valor rotulado o mínimo aceitável (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999; VADAS, 2000).

De acordo com o ICH (2003), os testes de estabilidade devem ser conduzidos em duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os testes acelerados de estabilidade (degradação forçada) servem para identificar os fatores que provocam a degradação do fármaco, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para fornecer informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos e para verificar se as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto se mantêm durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade da sitagliptina foi realizado por meio da degradação forçada do fármaco, para o desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e estudos de cinética de degradação. A cinética de degradação da sitagliptina em meio ácido foi determinada para auxiliar o estudo de estabilidade e conhecer a velocidade da reação.

Além disso, o objetivo foi isolar os dois produtos de degradação formados e analisá-los por UPLC-UV/MS a fim de determinar a identidade dos compostos.

No presente capítulo serão apresentados os testes de estabilidade em meio ácido (HCl 2,5 M). Será descrito o estudo da cinética de degradação do fármaco frente a este fator e os métodos de isolamento e identificação dos dois produtos de degradação formados.

**8.2. SITAGLIPTIN PHOSPHATE: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TWO
DEGRADATION PRODUCTS FORMED UNDER ACID CONDITIONS AND
DETERMINATION OF CYTOTOXICITY *IN VITRO***

Submetido ao periodico TALANTA

9. DISCUSSÃO GERAL

O agente hipoglicemiante fosfato de sitagliptina é utilizado para o tratamento do diabetes melittus tipo 2 e é o primeiro fármaco de uma nova classe terapêutica, os inibidores da dipeptidil peptidase IV. Embora de grande importância terapêutica, ainda não apresenta monografia em Códigos Oficiais. Fato este que destaca a importância do estudo que contempla o desenvolvimento de métodos analíticos, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade.

A caracterização da substância fosfato de sitagliptina, utilizada como referência neste estudo, foi realizada por espectrofotometria na região do IV, determinação do ponto e da faixa de fusão, análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN ^1H).

Na análise térmica por DSC, a presença de impurezas na amostra causa uma deformação no pico, alargando ou diminuindo a faixa de fusão do produto. O perfil de um pico puro apresenta-se afilado na análise por DSC (FORD e TINMINS, 1989). A faixa de fusão obtida por DSC mostrou-se mais ampla do que a faixa de fusão encontrada na técnica de determinação da faixa de fusão utilizando o equipamento tipo Koffler. Este alargamento pode ter ocorrido por uma possível degradação, considerando que a amostra apresentou coloração levemente amarelada após as análises sob temperatura elevada, ou por impurezas presentes na amostra. Entretanto, todos os métodos utilizados para a determinação da faixa ou ponto de fusão apresentaram valores semelhantes. Assim, a utilização do DSC ou análise do ponto de fusão pode auxiliar na caracterização do fosfato de sitagliptina, desde que, sejam empregados testes de identificação complementares.

A análise espectrofotométrica na região do infravermelho é uma impressão digital, única para cada composto (WATSON, 2005). Por esta razão, é um dos métodos mais empregados para a identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção de isômeros ópticos.

Desse modo, através do espectro de absorção no infravermelho foi possível identificar bandas de grupos funcionais característicos da sitagliptina, as quais

corroboram com a identificação da substância. A caracterização da SQR fosfato de STG também foi realizada através da RMN ^1H e da espectrometria de massas. A ressonância magnética nuclear é uma técnica extremamente eficaz para caracterizar exatamente uma estrutura química em matérias-primas (WATSON, 2005). Da mesma maneira, a espectrometria de massas é uma importante ferramenta para determinações qualitativas e quantitativas de vários componentes de uma amostra, pois ela fornece informações sobre o íon molecular permitindo correlacionar com características estruturais da amostra.

Desse modo, os resultados obtidos nos ensaios de RMN ^1H e espectrometria de massas demonstraram que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula fosfato de sitagliptina.

A identificação de substâncias por CCD é feita pela comparação dos fatores de retenção da substância com um padrão de identidade conhecida (GARCIA, 2007). Esta técnica apresenta-se como uma importante ferramenta na identificação de compostos. É de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Permite identificar o fármaco pela simples comparação entre os valores de fator de retenção obtidos (R_f).

Em busca de um valor adequado de R_f e R_x para identificação do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos, diversos sistemas foram testados, utilizando diferentes proporções de solventes polares e apolares. O sistema eluente mais apropriado para a identificação da STG em comprimidos revestidos foi metanol:acetonitrila:trietilamina (90:8:2 v/v/v). O desenvolvimento do método por CCD possibilita uma análise rápida da presença da STG em comprimidos revestidos.

A espectrofotometria na região do UV é um método útil na identificação de fármacos, oferecendo também, adequada precisão para determinações quantitativas de fármacos em formulações (WATSON, 2005). Os espectros de absorção obtidos na análise da SQR fosfato de sitagliptina e dos comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do ultravioleta em 207 nm, demonstraram ter perfis idênticos e valores máximos e mínimos de absorção iguais, sugerindo a mesma identidade das amostras.

A cromatografia líquida de alta eficiência surgiu, essencialmente, como uma técnica de separação, mas com os recursos que apresenta, passou a ocupar um lugar de destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa (COLLINS *et al.*, 1997).

O método de eletroforese capilar tem apresentado grande aplicabilidade na área farmacêutica, observando-se um crescente número de trabalhos na literatura. Trata-se de uma técnica rápida e com baixa utilização de solvente, mas cujo equipamento não está acessível a todos os laboratórios de controle de qualidade (GARCIA, 2007).

Os resultados obtidos na determinação qualitativa por CLAE e também por EC demonstraram que os tempos de retenção e migração para a SQR fosfato de sitagliptina e para os comprimidos revestidos são os mesmos, além disso, os cromatogramas e eletroferogramas foram idênticos, confirmando a presença do fosfato de sitagliptina nos comprimidos revestidos.

A fim de desenvolver e posteriormente validar o método por CLAE, diversos tipos e proporções de fase móvel foram testadas. Colunas cromatográficas de diferentes tamanhos (15 e 25 cm) também foram avaliadas. A fase móvel mais adequada foi composta por água adicionada de 0,3% de trietilamina, pH ajustado para 4,0 e acetonitrila (75:25 v/v). A adição da trietilamina na fase móvel permitiu a obtenção de picos mais simétricos e sem cauda, pois a adição de aminas à fase móvel afeta a separação de compostos básicos (SNYDER, 1997). Outras fases móveis também apresentaram bons resultados, no entanto, faziam uso de soluções tampão. A coluna que melhor se adequou à análise foi a Waters-XBridge C8 de 25 cm. Esta coluna possibilitou considerável melhoria na simetria do pico, fator de capacidade e número de pratos teóricos. Durante a validação do método por CLAE, a pureza do pico foi constantemente verificada, e este se mostrou puro em todos os casos, demonstrando não haver interferentes na quantificação da STG.

Quanto a técnica por eletroforese capilar é possível afirmar que o método permite a análise de compostos polares iônicos e não-iônicos, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais (SANTORO *et al.*, 2000). A EC permite também a análise de compostos neutros, isso é possível devido à presença

do fluxo eletroosmótico (FEO), o qual é gerado a partir dos grupamentos ácidos da sílica (TAVARES, 1995).

No desenvolvimento do método por eletroforese capilar, inúmeros ajustes foram feitos para estabelecer as condições ideais para a validação. A composição do eletrólito, voltagem aplicada, dimensões do capilar, temperatura de análise, modo e tempo de injeção da amostra, comprimento de onda são alguns dos parâmetros que devem ser considerados durante o desenvolvimento de um método (WATSON, 2005). A eletroforese capilar em zona livre foi primeiramente testada, no entanto, não apresentou resultados satisfatórios em relação à simetria do pico, em todas as análises foi possível observar a formação de cauda acentuada. Testou-se então a MECK como modo de separação. A adição de um tensoativo ao eletrólito proporcionou parâmetros adequados de simetria. Utilizou-se então o tampão TRIS adicionado de SDS, com pH ajustado para 10,6. A última diluição da amostra foi feita em água, pois um aumento considerável e significativo no número de pratos teóricos foi observado. A duloxetina na concentração de 30.0 µg/ml foi escolhida, após o teste de proporcionalidade, entre vários fármacos como padrão interno. Esta substância foi empregada para minimizar a variação do sistema de injeção e garantir a boa reprodutibilidade do método.

Os estudos de degradação forçada monitorados por CLAE e EC proporcionaram o conhecimento dos principais fatores de degradação e a validação de métodos indicativos de estabilidade. Os resultados obtidos nos ensaios de degradação sob condições variadas de estresse demonstraram a instabilidade do fosfato de sitagliptina em condições ácidas, básicas, fotolíticas (luz UV-C), térmicas e oxidativas. Durante esta fase de desenvolvimento do método analítico objetivou-se decaimento entre 5 a 20% do fármaco, evitando uma degradação muito drástica.

A avaliação da cinética de fotodegradação da STG foi realizada frente à luz UV-C. A degradação na luz UV-A, de menor energia, também foi examinada, no entanto, não houve decaimento considerável na área da solução amostra sob esta condição.

A cinética de fotodegradação da STG foi verificada a partir dos resultados obtidos no estudo preliminar de estabilidade. O estudo da cinética de degradação é

fundamental para o estudo da estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacionar, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975). As reações podem ser de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem. A ordem da reação é uma grandeza experimental determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando-se a concentração remanescente de amostras retiradas do decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975). Em concordância com a avaliação dos coeficientes de determinação, foi possível concluir que a fotodegradação da STG obedece a uma cinética de segunda ordem ($R^2 = 0,9838$).

De forma complementar, o teste de citotoxicidade foi realizado frente a células mononucleares humanas, empregando soluções de fosfato de STG degradadas em condições fotolíticas (luz UV-C). O rompimento da célula e a posterior liberação do LDH intracelular demonstram potencial citotóxico. Amostras de fosfato de STG com concentração inicial a partir de 50.0 µg/ml apresentaram importante efeito citotóxico, no entanto, este efeito não aumenta proporcionalmente à concentração do fármaco.

Os métodos analíticos propostos por CLAE e EC foram comparados estatisticamente. Os resultados da precisão dos métodos foram comparados utilizando o teste *t-student* para amostras independentes e variâncias equivalentes. Na comparação das metodologias validadas, o valor do *t calculado* apresentou-se menor que o *t tabelado* ($t_{calculado}=0,0333$ e $t_{(0,05;34)} = 2,032$), indicando que os métodos são equivalentes.

A dissolução é um teste cuja importância para a indústria farmacêutica vem sendo cada vez mais reconhecida. É aplicável tanto na pesquisa e desenvolvimento de produtos, como no controle de qualidade de rotina (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003). Apesar de não ter sido encontrada a classificação da sitagliptina no Sistema de Classificação Biofarmacêutico, pode-se inferir que o fármaco seja de Classe I, visto que apresenta alta solubilidade e biodisponibilidade de 87%.

A partir destas informações, diferentes meios com distintos valores de pHs, foram testados no desenvolvimento do método para os comprimidos revestidos de fosfato de sitagliptina. A velocidade de agitação também foi alterada para verificar a influencia deste fator na liberação do fármaco da formulação.

Para o desenvolvimento do teste de dissolução, foi necessário considerar a solubilidade do fármaco no meio de dissolução, bem como sua estabilidade no mesmo. A condição que forneceu uma liberação gradual do componente ativo da formulação farmacêutica apresentou a seguinte composição: tampão fosfato de potássio pH 6,8, pás a 50 rpm e 900 ml de meio. A STG mostrou-se bastante solúvel em todos os meios testados e sua estabilidade foi determinada no meio escolhido, tampão fosfato pH 6,8. O fármaco manteve-se estável por pelo menos 24 h na temperatura de 37 ± 0.5 °C.

Métodos desenvolvidos para a determinação quantitativa de fármacos em matéria-prima e produtos acabados são geralmente adaptáveis para o uso na determinação da quantidade de fármaco dissolvida em ensaios de dissolução (SKOUG *et al.*, 1997). Desse modo, o método validado por CLAE serviu para esta finalidade. A validação do método proposto mostrou que este é específico, linear, preciso e exato. A partir dos dados *in-vivo* obtidos na literatura foi possível associar a fração absorvida com a fração dissolvida (BERGMAN *et al.*, 2007). Ressalta-se ainda que, um perfil de dissolução mais lento, frequentemente, apresenta maior poder discriminativo, podendo ser empregado no controle de qualidade de formulações e processos.

O estudo da estabilidade do fosfato de sitagliptina foi realizado por meio da degradação forçada do fármaco para o desenvolvimento dos métodos indicativos de estabilidade. Testes preliminares de estabilidade haviam demonstrado que o meio ácido (HCl 1 M) não apresentava-se como um fator importante para a degradação entretanto, aumentando-se a concentração do ácido e expondo a amostra ao calor, foi possível observar a formação de dois produtos de degradação majoritários. Apesar de ser um fator interessante, não havia dados sobre a velocidade das reações. Desse modo, realizou-se o estudo da cinética de degradação da sitagliptina nesta condição de estresse (HCl 2,5M – 60 °C), a fim de auxiliar os estudos de isolamento posteriores. A condição ácida foi a escolhida para o isolamento, pois, sob

esta condição, foi possível observar a formação de dois produtos majoritários, enquanto que, em outros meios ocorria a formação de vários produtos de degradação em quantidades menores.

Os testes de degradação em meio ácido iniciaram sem a presença de calor, entretanto, o processo demonstrou ser muito lento. A fim de acelerar a degradação, submeteu-se a amostra a condição ácida (HCl 2.5 M), na presença de calor (60 °C), durante 6 horas. Esta estratégia reduziu consideravelmente o tempo do experimento.

A velocidade da reação foi determinada através da cinética de degradação no meio escolhido para o estudo da estabilidade e permitiu entender quanto do fármaco permanecia intacto e quando foi degradado com o decorrer do tempo. Os resultados apontaram uma degradação superior da solução de STG substância química de referência quando comparada à solução dos comprimidos revestidos após 6 horas de exposição. Observou-se aproximadamente 30% de degradação do fármaco na solução de STG SQR e aproximadamente 20% para a solução amostra dos comprimidos revestidos.

A análise dos coeficientes de determinação obtidos para cada reta traçada indicou que o processo de degradação da sitagliptina pode ser descrito por uma cinética de segunda ordem, tanto para a substância química de referência quanto para os comprimidos revestidos. De forma interessante, o estudo da cinética de fotodegradação da sitagliptina em solução aquosa frente à luz UV-C, descrito por LANGE e colaboradores em 2011, demonstra seguir a mesma ordem de reação determinada em meio ácido.

As amostras em contato com HCl 2.5 M a 60°C foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, neutralizadas e analisadas por HPLC. Foi possível observar a formação de dois picos referentes aos produtos majoritários principais. O método por HPLC anteriormente descrito e validado foi utilizado para quantificar a sitagliptina durante a cinética de degradação.

A etapa de isolamento pode ser considerada a mais complexa dentro de um estudo de estabilidade, pois diversos fatores podem interferir e devem ser avaliados para se obter a melhor técnica e condição para o isolamento e identificação dos

produtos formados. O método por CLAE necessitou ser otimizado para a utilização em UPLC-UV/MS. O método foi então ajustado a fim de separar e possibilitar a coleta dos produtos de degradação formados, denominados DP1 e DP2. A única mudança ocorreu na fase móvel, a qual foi composta somente por água pH 4,0 (ajustada com ácido fórmico) e acetonitrila em gradiente. Procedeu-se então a análise por UPLC-UV/MS das quatro soluções: Solução de STG SQR, solução STG comprimidos revestidos, solução DP1 isolado e solução DP2 isolado.

Essa técnica por UPLC-UV/MS une a grande capacidade de separação da CLAE com a sensibilidade e seletividade do detector de massas. Os espectros de massas resultantes possibilitaram a identificação dos produtos de degradação formados e isolados, com base no íon molecular e também permitiram sugerir a reação química da sitagliptina em meio ácido.

Na identificação do DP1, a presença do íon molecular com m/z 193.08 sugere que estamos diante do mesmo produto de degradação formado em meio básico, o qual foi isolado e identificado por El-Bagary e colaboradores em 2011. Além da similaridade do espectro de massas também podemos observar semelhança entre os espectros de UV apresentados. O DP1 é apresentado como 3-(trifluorometil)-5,6,7,8-tetra-hidro [1,2,4] triazolo [4,3-a] pirazina.

O produto DP2, denominado ((3R)-3-amino-4-ácido (2,4,5-trifluorofenil) butanóico), possui o íon molecular com m/z 234.08, o qual perde um fragmento ($C_2H_4O_2$) originando o pico de m/z 174.05.

O efeito citotóxico da solução composta pelos produtos de degradação formados foi avaliado frente a células mononucleares e permitiu concluir que a solução composta por DP1 e DP2 não apresenta efeito citotóxico na faixa de 10,0 a 250,0 $\mu\text{g/ml}$. O ensaio de citotoxicidade permite detectar danos em nível da membrana celular, conseqüente, quanto maior a perda da integridade membranar, maior o sinal espectrofotométrico. Se não ocorrer dano membranar, como é o caso da amostra composta pelos DP1 e DP2, a LDH permanece intracelularmente, não ocorrendo reação.

10. CONCLUSÕES

- ❖ A caracterização da SQR por espectrofotometria na região do IV, RMN ¹H e espectrometria de massas demonstrou que ela é adequada para ser utilizada como padrão. As técnicas por DSC, faixa e ponto de fusão, são adequadas para a caracterização, desde que, acompanhadas de outros testes de identificação;
- ❖ Os métodos propostos para a identificação da STG nos comprimidos revestidos, dentre eles, CCD, UV, CLAE e EC, mostraram-se adequados para a finalidade pretendida;
- ❖ A metodologia proposta por CLAE e EC apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequadas. Os métodos denominados indicativos de estabilidade demonstraram ser apropriados para a determinação quantitativa do fosfato de sitagliptina em comprimidos revestidos;
- ❖ A cinética de fotodegradação do fosfato de STG obedeceu à cinética de segunda ordem, fato comprovado após comparação dos coeficientes de determinação obtidos;
- ❖ A determinação do potencial citotóxico das amostras de STG degradadas frente à luz UV-C foi realizado e permitiu verificar que as amostras com concentrações iniciais acima de 50.0 µg/ml apresentam potencial efeito citotóxico;
- ❖ A análise da especificidade dos métodos por CLAE e EC permitiu obter dados que possibilitam verificar qual fator de estresse causa maior degradação. Estas informações auxiliaram o estudo da estabilidade do fosfato de sitagliptina.
- ❖ O desenvolvimento do ensaio de dissolução, utilizando tampão fosfato de potássio pH 6,8 e pás a 50 rpm, forneceram resultados adequados para a especificidade, linearidade, precisão e exatidão do método. A

partir dos resultados obtidos foi possível sugerir uma possível correlação *in vitro* – *in vivo*.

- ❖ Os resultados obtidos na avaliação da cinética de degradação da sitagliptina em meio ácido (HCl 2,5 M – 60 °C) indicam tratar-se de uma reação de segunda ordem.
- ❖ O método por UPLC-UV/MS permitiu a análise do fármaco e dos produtos de degradação isolados, permitindo propor a reação e a estrutura química dos compostos;
- ❖ Sugere-se que os compostos 3-(trifluorometil)-5,6,7,8-tetra-hidro [1,2,4] triazol [4,3-a]pirazina e (3R)-3-amino-4-ácido (2,4,5-trifluorofenil) butanóico sejam os produtos de degradação denominados DP1 e DP2 respectivamente.
- ❖ No ensaio de citotoxicidade frente a células mononucleares humanas, a solução contendo os dois produtos de degradação, denominados DP1 e DP2, não apresentou efeito citotóxico na faixa de concentração de 10-250 µg/ml.

11. REFERÊNCIAS

-
- ACD/pKa v8.02. ACD, Inc. Disponível em www.acdlabs.com, 2011.
- ABRAN – Associação Brasileira de Nutrologia. Importância Clínicas das Incretinas, 2007. Disponível em [http:// www.abran.org.br](http://www.abran.org.br), 2009.
- ADA - American Diabetes Association. The Dangerous Toll of Diabetes. Disponível em <http://www.diabetes.org/diabetesstatistics/dangerous-toll.jsp>, 2013;
- AHRE'N, B. DPP-4 inhibitors. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 517–533, 2007.
- AHRE'N, B. Emerging dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of diabetes. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v. 13, p. 593–607, 2008.
- ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, p. 204-213, 1998.
- AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlations on *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12(3), p. 413-419, 1995.
- AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, p. 85-96, 2003.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Harnessing the therapeutic potential of glucagon-like peptide-1: a critical review. **Treat. Endocrinology** v.1, p.117–125, 2002.
- BARNETT, A. H. New treatments in type II diabetes: a focus on the incretin based therapies. **Clinical Endocrinology**, v. 70, p. 343-353, 2009.
- BERGMAN, A. J.; STEVENS, C.; ZHOU, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: A double-blind, randomized, placebo controlled study in healthy male volunteers. **Clinical Therapy**. v. 28, p.55-72, 2006.
- BRANCHTEIN, L.; MATOS, M. C. G. Antidabéticos - Fundamentos da terapêutica racional. **Farmacologia Clínica**, p.832-844, 2004.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

BRASIL. Resolução - RE nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp. Número do processo: 25351065163200682, 2011.

CHARBONNEL, B.; KARASIK, A.; LIU, J. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. **Diabetes Care**, v. 29, p. 2638–2643, 2006.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro: **Interciência**, v. 287, p. 41-55, 2000.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. Cromatografia Líquida de alta eficiência. In: _____. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p. 279.

DEACON, C. F. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition with sitagliptin: a new therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin. Investig. Drugs*, v.16, p. 533–545, 2007.

DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: Glucagonlike peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase - 4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, p.1696–1705, 2006.

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

EMA. Scientific Discussion – Sitagliptin. 2007. Em: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/januvia/januvia.htm>

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 755-767, 2001.

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

FDA- Food and Drugs Administration. Information prescribing. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM204269.pdf>, 2011.

FORD, J., TINMINS, T. **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications**. New York: Ellis Hor Wood Limited, 1989. p.108-135.

GARCIA, C.V. Tese de doutorado: **Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HERMAN, G. A.; STEVENS, C.; VAN DYCK, K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: Results from two randomized, double-blind, placebo controlled studies with single oral doses. **Clinical Pharmacology Therapy**, v.78, p. 675-688, 2005.

HERMAN, G. A.; BERGMAN, A.; LIU, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the oral DPP-4 inhibitor sitagliptin in middle-aged obese subjects. **Journal Clinical Pharmacology**, v. 46, p. 876–886, 2006.

HOLST, J. J. Glucagon-like peptide-1, a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential. **Current Medicinal Chemistry** v. 6, p. 1005–1017, 1999.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A(R2). ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005a.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities: Guideline for Residual Solvents - Q3C (R3). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005b.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Substances - Q3A (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006a.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Products - Q3B (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006b.

IDF - International Diabetes Federation. Disponível em: www.idf.org <http://www.idf.org/media/press-materials/diabetes-data>, 2013.

JANUMET - Circular aos médicos. São Paulo, laboratório Merck Sharp & Dohme, 2008. Disponível em: http://devmerck.bizsolution.com.br/Janumet/pt_web/pt_mechanism_refs.shtml

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

KUHN, R.; HOFFSTETTER-KUHN, S. Capillary Electrophoresis: principles and practice. Germany: Springer-Verlag, p.375, 1993.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. Trends in stability testing with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-858, 1999.

LAMBEIR, A. M.; SHARPÉ, S.; DE MUSTE, I. DPP-4 inhibitors for diabetes – What next?. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 1637-1643 2008.

LINDEMBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

MALLESWARARAO, C.S.N.; SURYANARAYANA, M.V.; MUKKANTI, K. Simultaneous determination of sitagliptin phosphate monohydrate and metformin hydrochloride in tablets by a validated UPLC method. **Scientia Pharmaceutica**, v.80(1), p. 139-152, 2012

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

MARCOLONGO, R. Dissertação de mestrado: Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 2003. 117f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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.

- MERCK SHARP & DOHME - MSD. JANUVIA (fosfato de sitagliptina, MSD). Disponível em : http://www.msdbrazil.com/msdbrazil/corporate/products/br_produtos.html, 2013.
- METHA, A. C. Quality management in drug analysis. **Analyst**, v. 122, p. 83R-88R, 1997.
- MONILA, N.; PULLA, R.P.; SHABAD, H.; SWATHI, V.; RAJASEKHAR, J.; RAMESH, A.; REDDY, B.K.; UMASHANKAR, B. New extractive method development of sitagliptin phosphate in API and unit dosage forms by spectrophotometry. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.1, p.37-40, 2012.
- MU, J.; PETROV, A.; EIRMAN, G.J.; WOODS, J.; ZHOU, Y.; LI, Z.; ZYCBZND, E.; FENG, Y.; ZHU, L.; ROY, R.S.; HOWARD, A.D.; LI, C.; THORNBERRY, N.A.; ZHANG, B.B. Inhibition of DDP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v.623, p. 148-154, 2009.
- NAKANISHI, K. Infrared absorption spectroscopy. 2. ed. San Francisco: Holden-Day, 1977.
- NIGORI, R.; KANDIKERE, K.M.; KOMARNENI, P.; ALETI, R.; BOGGAVARAPU, R. Sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of sitagliptin, a DDP-4 inhibitor, in plasma using liquid-liquid extraction. **Biomedical Chromatography**, v.22, p. 214-222, 2008.
- NUDELMAN, N. S. Estabilidade de medicamentos. 1. ed. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.
- NYOLA, N.; JEYABALAN, G.S. Method development of simultaneous estimation of sitagliptin and metformin hydrochloride in pure and tablet dosage form by UV-Vis spectroscopy, **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.1(4), p. 1392-14-1, 2012.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S; VYVYAN, J. R. Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry. 4th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2009.
- PATHADE, P.; IMRAN, M.; BAIRAGI, V.; AHIRE, Y. Development and validation of stability indicating UV spectrophotometric method for the estimation of sitagliptin phosphate in bulk and tablet dosage form. **Journal of Pharmacy Research**, v.4, p.871-873, 2011.
- RAVANELLO, A.; DADALT, G.; TORRES, B.G.S.; HURTADO, F.K.; MARCOLINO, A.I.P.; ROLIM, C.M.B. Development and Validation of an UV-spectrophotometric

Method for the Dissolution Studies of Sitagliptin Tablets. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29 (6), p.962-967, 2010.

RAVANELLO, A.; DELGADO, L.S.; MARCOLINO, A.I.P.; CODEVILLA, C.F.; ADAMS, I.H.; ROLIM, C.M.B. A simple stability-indicating LC-UV method to assay sitagliptin phosphate in tablets. **Current Analytical Chemistry**, v.8(4), p. 569-573, 2012.

RIBANI, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C. Validação de Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

ROSA, R. S.; SCHMIDT, M. I. Diabetes mellitus: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil, 1999-2001. *Epidemiologia e Serviços de saúde*, v.17, 2008.

SALIM, M.; EL-ENANY, N.; BELAL, F.; WALASH, M.; PATONAY, G. Simultaneous determination os 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.

SANTORO, M. I. R. M.; PRADO, M. S. A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 36, n. 1, 2000.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes, disponível em: <http://www.diabetes.org.br/colunistas-da-sbd/diabetes-hoje/1081-mortes-por-diabetes-estao-aumentando-no-brasil>, 2011.

SBEM - SOCIEDADE BRASILEIRA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS <http://www.brmass.com.br/index.asp>

SEKARAN, C.B.; RANI, A.P. Development and validation of spectrophotometric method for the determination of DDP-4 inhibitor, sitagliptin, in its pharmaceutical preparations. **Eclética Química**, v. 35, p. 45-53, 2010.

SHAH, V.P.; NOORY, A.; NOORY, C.; MCCULLOUGH, B.; CLARKE, S.; EVERETT, R.; NAVIASKY, H.; SRINIVASAN, B.N.; FORTMAN, D.; SKELLY, J.P.; In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. **International Journal Pharmaceutical**, v. 125 p. 99-106, 1995.

SHARMA, S.; MANOCHA, N.; BHANDARI, P; HARSOLIYA, S.; JAIN, P. Development of a UV-spectrophotometry and RP-HPLC method and its validation for simultaneous estimation of sitagliptin phosphate and sinvastatin in marketed formulation. **International Journal of Pharmaceutical & biological Archives**, v.3(3), p. 673-678, 2012.

SILVA, M. E. R. Diabetes mellitus tipo 2. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58, p. 56-64, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, p. 293-321, 1997.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TAHRANI, A.A.; PIYA, M.K.; KENNEDY, A.; BARNETT, A.H. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 125, p. 328-361, 2010.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**. v. 19, n. 2, p. 173-181, 1995.

THORNBERRY, N. A.; GALLWITZ B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 23, p. 479-486, 2009.

USP 35. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 34th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2012.

VADAS, E. B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A.R. (Ed.). Remington. The Science and Practice of Pharmacy. 20. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wikins, p. 980-985, 2000.

WATSON, G. D. Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. London: Churchill Livingstone, 2005.

WHO - World Health Organization. Diabetes [WHO Web site]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>, 2011.

WHO - World Health Organization. Diabetes. Disponível em <http://www.afro.who.int/fr/maurice/materiels-pour-medias/2115-the-challenge-of-diabetes-by-2030-.html>, 2013.

ZENG, W.; XU, Y.; CONSTANZER, M.; WOOLF, E. J. Determination of sitagliptin in human plasma using protein precipitation and tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 878, p. 1817-1823, 2010.

ZENG, W.; MUSSON, D. G.; FISHER, A. L.; CHEN, L.; SCHWARTZ, M. S.; WOOLF, E. J.; WANG, A. Q. Determination of sitagliptin in human urine and hemodialysate

using turbulent flow online extraction and tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 534-542, 2008.

ZHANG, B.B. Inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, p. 148–154, 2009.

