

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

**VILDAGLIPTINA E ASSOCIAÇÃO COM METFORMINA: DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA, ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO DA
ESTABILIDADE**

AMANDA THOMAS BARDEN

Porto Alegre

2014

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

**VILDAGLIPTINA E ASSOCIAÇÃO COM METFORMINA: DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA, ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E ESTUDO DA
ESTABILIDADE**

Tese apresentada por **AMANDA THOMAS
BARDEN** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe
Coorientador: Prof^a. Dr. Nadia M. Volpato

Porto Alegre
2014

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 21.05.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Hérica Regina Nunes Salgado

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Profa. Dr. Patrícia Gomes

Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Thomas Barden, Amanda

Vildagliptina e associação com metformina:
desenvolvimento de metodologia analítica, ensaio de
dissolução e estudo da estabilidade / Amanda Thomas
Barden. -- 2014.
219 f.

Orientador: Martin Steppe.

Coorientadora: Nadia Maria Volpato.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2014.

1. Vildagliptina. 2. Metformina. 3. Métodos
analíticos. 4. Produtos de degradação. 5. Validação. I.
Steppe, Martin, orient. II. Volpato, Nadia Maria,
coorient. III. Título.

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

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul); no Laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria e no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO).

AGRADECIMENTOS

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

A minha coorientadora, Prof. Nadia Volpato, pela disponibilidade na retirada de dúvidas e exemplo profissional;

Aos meus pais, em especial a minha mãe Vânia que sempre me apoiou e me incentivou na realização dos meus sonhos. Mesmo estando em outro plano espiritual há pouco tempo, tenho certeza que, está torcendo por mim como sempre o fez. Ao meu irmão Alisson, pela compreensão, incentivo e principalmente pelo apoio.

Ao meu noivo Eduardo, pelo amor, amizade, apoio, incentivo e compreensão.

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

Aos amigos, colegas e ex-colegas do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) pelos momentos de descontração e discussões científicas. Em especial, às amigas Mariana, Márcia e Rita pela amizade, incentivo e motivação nessa etapa tão difícil da minha vida.

À Prof. Dr. Teresa Dalla Costa, por disponibilizar o espectrômetro de massas do Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia da UFRGS e, em especial, à amiga Maiara pela ajuda prestada na realização das análises e importante colaboração neste trabalho. Ao Fabiano, pela ajuda e discussões para a realização dos experimentos de identificação dos produtos de degradação e ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) pela disponibilidade dos equipamentos para tal identificação.

Ao Prof. Érico Flores, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria pela disponibilidade para a utilização do equipamento de CLUE-EM/EM

(TOF) e ao pessoal do laboratório pela receptividade, discussões e possibilidade de aprendizagem.

À UFRGS, pela possibilidade de execução desse trabalho.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos.

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

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

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

- Introdução;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Revisão bibliográfica;
- Capítulo I: Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação qualitativa de vildagliptina em comprimidos e associação com cloridrato de metformina em comprimidos revestidos;
- Capítulo II: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação quantitativa de vildagliptina e metformina em comprimidos revestidos, estudos de estabilidade, identificação de produtos de degradação e estudo da citotoxicidade – Encarte de publicações;
- Capítulo III: Ensaio de dissolução para vildagliptina em comprimidos e ensaio de dissolução para a associação de vildagliptina e cloridrato de metformina em comprimidos revestidos – Encarte de publicações;
- Referências.

RESUMO

A vildagliptina (VLG) e o cloridrato de metformina (MET) são fármacos utilizados no tratamento da diabetes mellitus tipo 2. Esses fármacos podem ser utilizados como monoterapia ou em associação como terapia complementar. A análise de fármacos dentro da área do controle de qualidade é essencial para averiguar se os medicamentos comercializados são seguros e confiáveis do ponto de vista terapêutico e farmacológico. Existem poucos relatos de determinação quantitativa e de estudo de estabilidade encontrados na literatura para a VLG em comprimidos e também para a VLG em associação com metformina em comprimidos revestidos. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos qualitativos e quantitativos, tanto para a VLG quanto para a determinação dos fármacos em associação, realizar o estudo da estabilidade e ensaios de dissolução (utilizando os métodos de CLAE e UV derivada para avaliação). Métodos analíticos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) foram desenvolvidos e validados para a determinação de VLG em comprimidos e de VLG em associação com MET em comprimidos revestidos. Os resultados encontrados foram adequados, de acordo com o preconizado pelos guias oficiais nacionais e internacionais, e os métodos foram considerados validados. Esse trabalho ainda, apresenta o desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) para análise dos referidos fármacos em associação e identificação dos produtos de degradação formados a partir das principais condições de degradação às quais os fármacos foram suscetíveis. Ainda, avaliou-se a citotoxicidade em células mononucleares humanas desses produtos de degradação os quais não demonstraram potencial citotóxico. Além disso, foram desenvolvidos e validados dois métodos de dissolução (um para VLG em comprimidos e outro para VLG em associação com MET) pelos quais foi possível realizar o controle de qualidade das formas farmacêuticas a partir dos perfis de dissolução dos fármacos nos meios selecionados. Os resultados obtidos pelos métodos foram comparados estatisticamente por ANOVA, que indicou não haver diferenças estatísticas significativas entre os métodos propostos.

Palavras-chave: vildagliptina, cloridrato de metformina, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, ensaio de dissolução, UV derivada, espectrometria de massas, citotoxicidade, produtos de degradação, validação.

ABSTRACT

Vildagliptin (VLG) and metformin hydrochloride (MET) are drugs used in the treatment of type 2 diabetes mellitus. These drugs may be used as monotherapy or as adjunctive therapy. The analysis of drugs in the area of quality control is essential to establish whether the marketed drugs are safe and reliable in terms of therapeutic and pharmacological aspects. Few reports were found for quantitative determination and stability study in the literature for VLG in tablets and also to VLG in association with metformin in coated tablets. Thus, the aim of this study was to develop and validate qualitative and quantitative analytical methods for both VLG and for the determination of drugs in association, to perform study of stability and dissolution tests (using HPLC and derivative UV spectrophotometric methods for this evaluation). Analytical methods by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) were developed and validated for the determination of VLG tablet and VLG in association with MET in coated tablets. The results found were adequate, according to nacional and international official guides, and the methods were considered validated. This work also performed the development and validation of an analytical method by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for pharmaceutical analysis for both studied drugs and identification of degradation products formed in the main degradation condition which both drugs are susceptible. Moreover, it was performed the cytotoxicity evaluation for degradation products against human mononuclear cells and these products did not demonstrate potential cytotoxicity. Furthermore, were developed and validated two dissolution methods (one for VLG in tablet formulation and another for VLG in association with MET) which was possible to perform the quality control for the pharmaceutical dosage forms as from dissolution patterns of theses drugs in the selected dissolution medium. The results of the methods were statistically compared using ANOVA that showed no statistically significant differences between the proposed methods.

Keywords: vildagliptin, metformin hydrochloride, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, dissolution test, derivative UV spectrophotometry, mass spectrometry, cytotoxicity, degradation products, validation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 3.1. Estrutura química do cloridrato de metformina. | 15 |
| Figura 3.2. Estrutura química da vildagliptina. | 16 |
| Figura 3.3. Mecanismo de ação dos inibidores da DPP-4. (Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012) | 17 |
| Figura 4.1 Cromatogramas sobrepostos do padrão de VLG (a) e da solução amostra dos comprimidos de VLG (b) a 50,0 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de solução de fosfato de potássio pH 7,0 : acetonitrila (85:15, v/v), vazão de 1,0 mL/min, coluna Zorbax Eclipse Plus C ₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 25 °C, detecção em 207 nm e volume de injeção de 20 µL. | 31 |
| Figura 4.2 Cromatogramas sobrepostos do padrão de VLG (a) e da solução amostra dos comprimidos de VLG e MET (b) a 100,0 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de solução de heptanossulfonato de sódio pH 3,0 : acetonitrila : metanol (81:18:1, v/v/v), vazão de 1,0 mL/min, coluna Zorbax Eclipse Plus C ₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 25 °C, detecção em 207 nm e volume de injeção de 20 µL. | 32 |
| Figura 4.3 Cromatogramas sobrepostos do padrão de MET (a) e da solução amostra dos comprimidos de VLG e MET (b) a 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de solução de heptanossulfonato de sódio pH 3,0 : acetonitrila : metanol (81:18:1, v/v/v), vazão de 1,0 mL/min, coluna Zorbax Eclipse Plus C ₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 25 °C, detecção em 250 nm e volume de injeção de 20 µL. | 32 |
| Figura 4.4 Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do padrão e da amostra de vildagliptina por CLAE. | 33 |
| Figura 4.5 Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do padrão e da amostra de cloridrato de metformina por CLAE. | 34 |
| Figura 4.6 Sobreposição dos eletroferogramas obtidos para a solução padrão e amostra de vildagliptina por CZE. | 37 |

Figura 4.7 Sobreposição dos eletroferogramas obtidos para a solução padrão de VLG e amostra de vildagliptina e cloridrato de metformina por CZE em 207 nm (a) e sobreposição dos eletroferogramas obtidos para a solução padrão de MET e amostra de vildagliptina e cloridrato de metformina por CZE em 250 nm (b).38

Figura 4.8 Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do padrão e da amostra de vildagliptina (a) e do padrão e da amostra de metformina (b) obtidos por EC.39

Figura 4.9. Cromatogramas CLAE-EM/EM das soluções padrão e amostra de VLG e MET na concentração de 2 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel composta de acetonitrila : ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v), vazão de 0,45 mL/min, coluna Agilent C₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 30 °C, volume de injeção de 10 µL. Análise espectral de massas: ionização por eletronebulização positiva, operação no modo MRM, nas transições monitoradas de 303,8>153,4 e 129,4>70,8.....42

Figura 4.10. Cromatogramas CLUE-EM das soluções padrão e amostra de VLG e MET na concentração de 2 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel composta de acetonitrila : ácido fórmico 0,1% : acetonitrila (95:5, v/v), vazão de 0,35 mL/min, coluna Acquity HSS T3 Waters® (50 mm x 2,1 mm; 1,8 µm), temperatura de 30 °C, volume de injeção de 2 µL. Análise espectral de massas: ionização por eletronebulização positiva, monitorados os íons *m/z* 304,1 (VLG) e *m/z* 130,1 (MET).45

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1. Lista das substâncias utilizadas no tratamento da DM-2..... | 13 |
| Tabela 4.1 Condições cromatográficas empregadas para identificação de VLG nos comprimidos por CLAE..... | 29 |
| Tabela 4.2 Condições cromatográficas empregadas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por CLAE. | 30 |
| Tabela 4.3. Parâmetros de adequabilidade do sistema encontrados para VLG (207 nm) e MET (250 nm) por CLAE. | 33 |
| Tabela 4.4. Condições eletroforéticas empregadas para identificação de VLG nos comprimidos por EC. | 35 |
| Tabela 4.5. Condições eletroforéticas empregadas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por EC. | 36 |
| Tabela 4.6. Condições cromatográficas e parâmetros do espectrômetro de massas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por CLAE-EM/EM. .. | 40 |
| Tabela 4.7. Condições cromatográficas e parâmetros do espectrômetro de massas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por CLUE-EM. | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-UV – Espectrofotometria derivada no ultravioleta de segunda ordem;
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ANOVA – Análise da variância;
BGE – *Background electrolyte*;
CE – *Capillary electrophoresis*;
CIVIV – Correlação *in vitro* – *in vivo*;
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/UV – Cromatografia líquida com detecção no ultravioleta;
CLAE/EM – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas;
CLAE/EM-EM – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial;
CLUE/EM – Cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas;
CZE – *Capillary zone electrophoresis* – eletroforese capilar de zona;
DM – *Diabetes mellitus*;
DM-2 – *Diabetes mellitus* tipo 2;
DPP-4 – dipeptilpeptidase-4;
DPR – Desvio padrão relativo;
EC – Eletroforese capilar;
EMA – *European Medicines Agency*;
ESI – *Electrospray ionization* – eletronebulização;
ESI⁺ - *Electrospray source in positive mode* – eletronebulização positiva;
FDA – *Food and Drug Administration*;
GIP – *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide* - Polipéptido insulínico dependente de glucose;
GLP-1 – *Glucagon like peptide 1* - Peptídeo 1 semelhante ao *glucagon*;
HPLC – *High performance liquid chromatography*;
ICH – *International Conference on Harmonisation*;
IS – *Internal standard* – padrão interno;
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*;
LC – *Liquid chromatography* - cromatografia líquida;
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas;
LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial;
LDH – Lactato desidrogenase;
LOD – *Limit of detection* - limite de detecção;
LOQ – *Limit of quantitation* - limite de quantificação;
MEKC – Cromatografia eletrocínética micelar;
MET – Metformina;
MRM – *Multiple reaction monitoring mode* – monitoramento de múltiplas reações;
MS – *Mass spectrometry* – Espectrometria de massas;
m/z – Relação massa/ carga;

PDA – *Photodiode array detector*
RH – *Ranitidine hydrochloride* - Cloridrato de ranitidina;
RP-LC – Cromatografia líquida em fase reversa;
RSD – *Relative standard deviation* – Desvio padrão relativo;
SCB – Sistema de Classificação Biofarmacêutica;
SDS – dodecilssulfato de sódio;
T2DM – *Type 2 Diabetes mellitus* – *Diabetes mellitus* tipo 2;
TRIS – Hidroximetil aminometano
USP – *United States Pharmacopeia* – Farmacopeia Americana;
UV – Ultravioleta;
UV/PDA – Detector ultravioleta com arranjo de fotodiodos;
VLG – Vildagliptina.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 7 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 7 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 3.1. ASPECTOS GERAIS..... | 11 |
| 3.2. FÁRMACOS HIPOGLICEMIANTES | 12 |
| 3.2.3. Metformina..... | 14 |
| 3.2.4. Vildagliptina | 15 |
| 3.2.5. Associação entre vildagliptina e cloridrato de metformina | 17 |
| 3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS | 18 |
| 3.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 18 |
| 3.3.2. Eletroforese capilar (EC) | 19 |
| 3.3.3. Espectrofotometria UV derivada | 20 |
| 3.4. ESTABILIDADE DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS | 21 |
| 3.5. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO | 21 |
| 3.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DE VILDAGLIPTINA E METFORMINA..... | 22 |
| 4. CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO QUALITATIVA | 27 |
| 4.1. INTRODUÇÃO | 27 |
| 4.2. PRODUTOS FARMACÊUTICOS | 28 |
| 4.3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS..... | 28 |
| 4.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 28 |
| 4.3.1.1. Condições cromatográficas..... | 28 |
| 4.3.1.1.1. Análise qualitativa de vildagliptina | 29 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1.1.2. Análise qualitativa de vildagliptina e cloridrato de metformina..... | 29 |
| 4.3.1.1.3. Resultados e Discussão | 30 |
| 4.3.2. Eletroforese capilar (EC) | 34 |
| 4.3.2.1. Condições eletroforéticas | 34 |
| 4.3.2.1.1. Análise qualitativa de vildagliptina | 34 |
| 4.3.2.1.2. Análise qualitativa de vildagliptina e cloridrato de metformina..... | 35 |
| 4.3.2.1.3. Resultados e Discussão | 36 |
| 4.3.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)..... | 39 |
| 4.3.3.1. Condições cromatográficas | 39 |
| 4.3.3.1.1. Resultados e discussão | 41 |
| 4.3.4. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) | 43 |
| 4.3.4.1. Condições cromatográficas | 43 |
| 4.3.4.1.1. Resultados e discussão | 44 |
| 4.4. DISCUSSÃO..... | 46 |
| 4.5. CONCLUSÕES..... | 46 |
| 5. CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA, ESTUDOS DE ESTABILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E CITOTOXICIDADE | 49 |
| 5.1. Introdução | 49 |
| 5.2. ARTIGO: CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF VILDAGLIPTIN (A DPP-4 INHIBITOR) IN PHARMACEUTICAL FORMULATION AND COMPARATIVE STUDY WITH HPLC..... | 55 |
| 5.2.1. RESUMO | 55 |
| 5.3. ARTIGO: SIMULTANEOUS ASSAY METHOD BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR A FIXED DOSE COMBINATION OF VILDAGLIPTIN AND METFORMIN HYDROCHLORIDE IN COATED TABLETS..... | 73 |
| 5.3.1. RESUMO | 75 |

| | |
|---|-----|
| 5.4. ARTIGO: QUANTITATIVE DETERMINATION, IDENTIFICATION OF VILDAGLIPTIN AND METFORMIN DEGRADATION PRODUCTS BY LC-MS/MS AND CYTOTOXICITY IN VITRO ASSAY | 97 |
| 5.4.1. RESUMO | 97 |
| 5.5. DISCUSSÃO..... | 120 |
| 5.6. CONCLUSÕES..... | 126 |
| 6. CAPÍTULO III: ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO..... | 129 |
| 6.1. Introdução | 129 |
| 6.2. ARTIGO: SECOND-ORDER DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRIC AND RP-HPLC METHODS FOR THE ANALYSIS OF VILDAGLIPTIN AND ITS APPLICATION FOR DISSOLUTION STUDY | 131 |
| 6.2.1. RESUMO | 133 |
| 6.3. ARTIGO: STABILITY INDICATING RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION AND IN VITRO DISSOLUTION STUDIES FOR VILDAGLIPTIN AND METFORMIN IN COATED TABLETS | 153 |
| 6.3.1. RESUMO | 153 |
| 6.4. DISCUSSÃO..... | 172 |
| 7. CONCLUSÕES GERAIS | 177 |
| 8. REFERÊNCIAS | 181 |

1. INTRODUÇÃO

Diabetes é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não pode utilizar eficazmente a insulina que produz. A hiperglicemia é um efeito comum da diabetes descompensada e, a longo prazo, leva a sérios danos no organismo, especialmente aos nervos e aos vasos sanguíneos (JONES *et al.*, 2009).

De acordo com os últimos dados, cerca de 366 milhões de pessoas no mundo possuem diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011). Os dados indicam que a diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) pode ser cerca de 8 a 10 vezes mais comum que o tipo 1. Alguns estudos mais recentes apontam para a presença de 12 milhões de pessoas com diabetes no Brasil, das quais 50% desconhecem que tem a doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Dentre as abordagens farmacológicas que podem ser utilizadas para o tratamento da DM-2 estão os inibidores da enzima dipeptidilpeptidase-4 (DPP-4), tal como a vildagliptina (VLG) e os redutores da neoglicogênese, como a metformina (MET). Para alcançar o controle glicêmico ideal, muitos pacientes necessitam de tratamento com mais de um fármaco hipoglicemiante (YARDIMCI & ÖZALTIN, 2005; HENNESS & KEAM, 2006). A vildagliptina melhora o controle glicêmico em pacientes com DM-2 quando utilizada em monoterapia (PI-SUNYER *et al.*, 2007) ou como terapia complementar em combinação com metformina (BOSI *et al.*, 2007; BOLLI *et al.*, 2009). O medicamento contendo VLG em comprimidos (Galvus[®]) e VLG em associação com MET em comprimidos revestidos (GalvusMet[®]) foram aprovados na Europa e, desde 2007, estão disponíveis e aprovados no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o tratamento dessa enfermidade.

Para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos, é essencial atender a requisitos regulamentares visando o constante monitoramento e avaliação dos fármacos em todas as fases do desenvolvimento farmacêutico. Para isso, o desenvolvimento e a validação de métodos que atendam às exigências das aplicações analíticas e assegurem a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados torna-se fundamental (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2013).

Diante do exposto, reforça-se a importância desse trabalho uma vez que a falta de métodos confiáveis para avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos. Somente a validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade dos fármacos juntamente com o estudo dos fatores que afetam a estabilidade dos mesmos, assim como, a identificação dos produtos de degradação e a análise da toxicidade, garantindo a administração terapêutica dos medicamentos de maneira segura e eficaz evitando, assim, efeitos adversos e diminuição da atividade farmacológica.

Considerando o exposto, destaca-se que foram encontrados poucos registros disponíveis de métodos para determinação quantitativa de VLG e MET em produto acabado. Também, verificou-se, que não existem estudos publicados sobre a estabilidade de ambos na forma farmacêutica comercializada, assim como, das condições para avaliação da dissolução dos mesmos.

Dessa forma, justificam-se o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos de modo a avaliar a qualidade dos fármacos em comprimidos revestidos, assim como estudar a dissolução e a estabilidade desses compostos, aprimorando e contribuindo a área de controle da qualidade visando garantir a segurança e eficácia dos medicamentos comercializados no país.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos capazes de determinar o teor de vildagliptina em comprimidos bem como sua associação com metformina, avaliar a estabilidade das formulações e toxicidade dos produtos de degradação.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar métodos analíticos através de:
 - EC/UV e CLAE/UV para avaliação de comprimidos contendo vildagliptina e contendo vildagliptina em associação com metformina;
 - CLAE-EM/EM para determinação simultânea de comprimidos revestidos contendo vildagliptina e metformina;
- Caracterizar a estabilidade dos fármacos frente a diferentes condições de estresse;
- Identificar os principais produtos de degradação dos fármacos por CLAE-ESI/EM;
- Avaliar o potencial citotóxico das amostras contendo os fármacos após degradação frente às amostras dos fármacos íntegros;
- Desenvolver e validar o método de dissolução dos comprimidos de vildagliptina e dos comprimidos revestidos de vildagliptina e metformina;
- Desenvolver e validar o método por CLAE (VLG e associação de VLG e MET) e UV derivada (VLG) para avaliação quantitativa dos fármacos nos testes de dissolução.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ASPECTOS GERAIS

A DM-2 causa cerca de 5% de todas as mortes a cada ano no mundo (JONES *et al.*, 2009). Essa patologia é considerada uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. As crescentes incidência e prevalência são atribuídas ao envelhecimento populacional, aos avanços terapêuticos no tratamento da doença, mas, especialmente, ao estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e hábitos alimentares que predispõem ao acúmulo de gordura corporal (PÉRES *et al.*, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011).

A DM-2 é considerada uma doença crônica de etiologia múltipla que altera a qualidade de vida dos indivíduos afetados e envolve inúmeros defeitos fisiopatológicos. Dentre eles, está o comprometimento da função das ilhotas de Langerhans (pâncreas) e da resistência à insulina que resultam em intolerância à glicose e produção inadequada da glicose hepática em jejum (HALIMI *et al.*, 2008; SRINIVASAN *et al.*, 2008).

O padrão de diabetes varia consideravelmente de acordo com o *status* econômico dos países. Para os países desenvolvidos, a maior parte das pessoas com diabetes têm idade maior de 60 anos, enquanto que para os países em desenvolvimento a maioria das pessoas com diabetes estão na faixa etária entre 40 e 60 anos. Segundo estimativas, o crescimento e o envelhecimento populacional e a urbanização, associadas com mudança no estilo de vida, tendem a conduzir um aumento de 54% no número de pacientes com diabetes no mundo todo para 2030 (SHAW *et al.*, 2010).

Há duas classificações atuais para a diabetes que baseiam-se na etiologia da doença e não no tipo de tratamento. Na DM tipo 1 o paciente é insulino-dependente, isto é, não produz insulina e precisa receber insulina para manter os níveis adequados de glicose no sangue. A DM tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida. Na DM tipo 2 o paciente produz insulina em quantidades insuficientes e o

organismo desenvolve resistência aos efeitos da insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. A DM tipo 2 resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000; WHO, 2012).

Aproximadamente metade dos portadores de diabetes tipo 2 desconhecem sua condição, uma vez que a doença é pouco sintomática. Por ser pouco sintomática a DM-2, na maioria das vezes, permanece por muitos anos sem diagnóstico e sem tratamento o que favorece a ocorrência de suas complicações no coração e no cérebro. O diagnóstico precoce do diabetes é importante pois o tratamento evita o agravamento do quadro. Quando presentes, os sintomas mais comuns são: micção e sede excessivas, aumento do apetite, perda de peso, cansaço, vista embaçada ou turvação visual, infecções frequentes, sendo as mais comuns, as infecções de pele (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012).

Para alcançar o controle glicêmico, no tratamento dessa doença são consideradas modificações no estilo de vida, incluindo ajustes na dieta e aumento da atividade física. Porém, o controle da DM-2 se torna cada vez mais difícil, uma vez que a doença vai progredindo e os pacientes adquirem múltiplas comorbidades. Nesse contexto, se faz necessário optar por um tratamento farmacológico para retardar ou inibir o desenvolvimento dos sintomas decorrentes da doença (FONSECA *et al.*, 2007; AHRÉN, 2008).

3.2. FÁRMACOS HIPOGLICEMIANTES

Os agentes hipoglicemiantes orais atuam por diferentes mecanismos de ação: os chamados secretagogos de insulina (sulfonilureias e glinidas), os sensibilizadores da insulina (tiazolidinodionas), os redutores da neoglicogênese (biguanidinas), os inibidores da absorção rápida de carboidratos (inibidores da α -glicosidase) e a insulina (LOPES *et al.*, 2012).

Devido às alterações fisiopatológicas que podem estar associadas com a DM-2, a utilização de medicamentos que atuam com diferentes mecanismos de ação, nas diversas fases de tratamento da doença, às vezes é necessária para a manutenção adequada do tratamento. Na Tabela 3.1, estão apresentadas as classes de agentes

hipoglicemiantes atualmente disponíveis, seus mecanismos de ação, assim como suas vantagens e desvantagens (limitações).

Tabela 3.1. Lista das substâncias utilizadas no tratamento da DM-2.

| Classe | Fármacos | Mecanismo de ação | Via de administração | Vantagens | Desvantagens |
|--|--|--|----------------------|---|---|
| Sulfonilureias (BOLEN <i>et al.</i> , 2007; NATHAN <i>et al.</i> , 2009) | Glicazida Glipizida Glimepirida Glibenclamida | Estímulo da secreção de insulina por ligação a receptores das células β -pancreáticas | Oral | Segurança a longo prazo Baixo custo | Hipoglicemia Ganho de peso Necessidade de monitoramento da glicose sanguínea |
| Biguanidas (GALLEGO, 2006; SCHWARTZ <i>et al.</i> , 2006; LIBBY <i>et al.</i> , 2009) | Metformina | Redução da resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e outros tecidos periféricos com inibição da gliconeogênese hepática | Oral | Segurança a longo prazo Neutralidade de peso Baixo risco de hipoglicemia Baixo custo | Efeitos gastrointestinais indesejáveis |
| Meglitinidas (RAMALHO <i>et al.</i> , 2006). | Nateglinida Repaglinida | Ligação a receptores das células β -pancreáticas | Oral | Rápida e curta duração Adequada para uso prandial | Poucos dados de segurança a longo prazo Ganho de peso Hipoglicemia Necessidade de monitoramento da glicose sanguínea |
| Inibidores da α -glicosidase (SRINIVASAN, 2008; LOPES <i>et al.</i> , 2012) | Acarbose Miglitol | Inibição da degradação de carboidratos no intestino | Oral | Neutralidade de peso Baixo custo | Efeitos gastrointestinais indesejáveis |
| Tiazolidinodionas (BOLEN <i>et al.</i> , 2007; NISSEN & WOLSKI, 2007; NISSEN & WOLSKI, 2010; FDA, 2010) | Pioglitazona | Aumento da sensibilidade à insulina no músculo e fígado Aumento da adipogênese e redução de ácidos graxos livres | Oral | Baixo risco de hipoglicemia Pode reduzir a pressão sanguínea | Segurança a longo prazo não estabelecida: risco de ganho de peso, edema, insuficiência cardíaca e fraturas ósseas |

| | | | | | |
|---|---|--|--------------------|--|--|
| Incretinomiméticos (AMORI <i>et al.</i> , 2007; TODD <i>et al.</i> , 2007; BUSE <i>et al.</i> , 2009; GILBERT <i>et al.</i> , 2009; MONAMI <i>et al.</i> , 2009) | Exenatida Liraglutida | Aumento da secreção de insulina e diminuição da secreção de <i>glucagon</i> | Injeção subcutânea | Perda de peso Baixo risco de hipoglicemia (se não combinadas com sulfoniluréias) | Desconhecida segurança a longo prazo Efeitos gastrointestinais indesejáveis Evitar quando insuficiência renal |
| Inibidores da DPP-4 (DOUPIS & VEVES, 2008; SRINIVASAN <i>et al.</i> , 2008; NATHAN <i>et al.</i> , 2009) | Sitagliptina Vildagliptina Saxagliptina | Aumento da concentração de incretinas endógenas | Oral | Neutralidade de peso Baixo risco de hipoglicemia (se não combinadas com sulfoniluréias) | Desconhecida segurança a longo prazo |
| Análogos da amilina (ALFONSO & ARIZA, 2008; HOOGWERF <i>et al.</i> , 2008; WEINERT <i>et al.</i> , 2010; LOPES <i>et al.</i> , 2012). | Pramlintida | Supressão da secreção de <i>glucagon</i> pós-prandial | Injeção subcutânea | Perda de peso | Desconhecida segurança a longo prazo Aumenta risco de hipoglicemia associada à insulina Somente usada com insulina |
| Insulina (DEL PRATO <i>et al.</i> , 2009; HEMKENS <i>et al.</i> , 2009) | Rápida, curta, longa e intermediária duração | Diminuição da glicose hepática, aumento do uso periférico e diminuição da lipólise | Injeção subcutânea | Glicemia sustentada | Ganho de peso Hipoglicemia Necessidade de monitoramento da glicose sanguínea Retenção de líquidos |

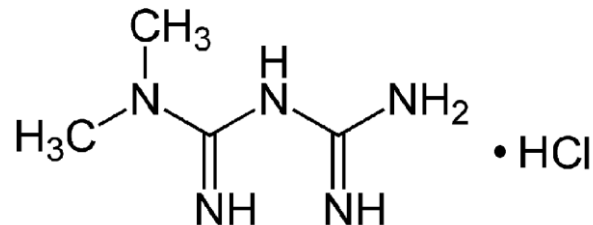
*Continuação

3.2.3. Metformina

Da classe das biguanidinas, a metformina (Figura 3.1) é o único representante disponível atualmente. Esse fármaco foi introduzido no tratamento da DM-2 no final da década de 50 na Europa e na metade da década de 90 nos EUA. Atua através da redução da resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e outros tecidos periféricos,

com consequente inibição da gliconeogênese hepática (BOSI *et al.*, 2009; NATHAN, 2009).

Figura 3.1. Estrutura química do cloridrato de metformina.



Assim, seu principal efeito ocorre sobre a glicemia de jejum, sem acarretar hipoglicemia. Diferentemente do que ocorre nas outras classes de fármacos hipoglicemiantes, a metformina não está associada ao ganho de peso e pode até mesmo reduzir o peso nos pacientes (GALLEGO, 2006; LIBBY *et al.*, 2009).

Como efeitos colaterais, náusea, diarreia e dor abdominal acometem até um terço dos pacientes. Para minimizar esse efeito deve ser introduzida gradualmente e administrada durante as refeições, podendo resultar em melhor tolerância em até 90% dos pacientes com uso continuado (SCHWARTZ *et al.*, 2006).

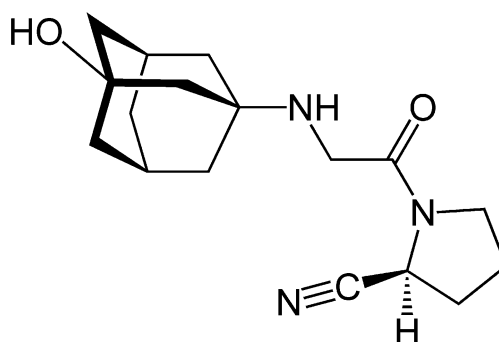
A metformina possui absorção incompleta, pois aproximadamente 30% da dose é eliminada diretamente nas fezes. A biodisponibilidade oral é de 40% a 60% e não sofre metabolização sendo excretada inalterada pelos rins. Não foram encontrados metabólitos ou conjugados da metformina que tenham sido identificados (CAMPBELL *et al.*, 1996; SETTER *et al.*, 2003).

3.2.4. Vildagliptina

A vildagliptina possui baixo risco de causar hipoglicemia, mantém o peso normal e, em geral, é bem tolerada. A adição de vildagliptina amplia a gama de opções de tratamento disponíveis e, como tal, oferece maior potencial para o manejo de pacientes com DM-2 que não são adequadamente controlados em monoterapia utilizando outros fármacos (MATHIEU, 2008; KEATING, 2010).

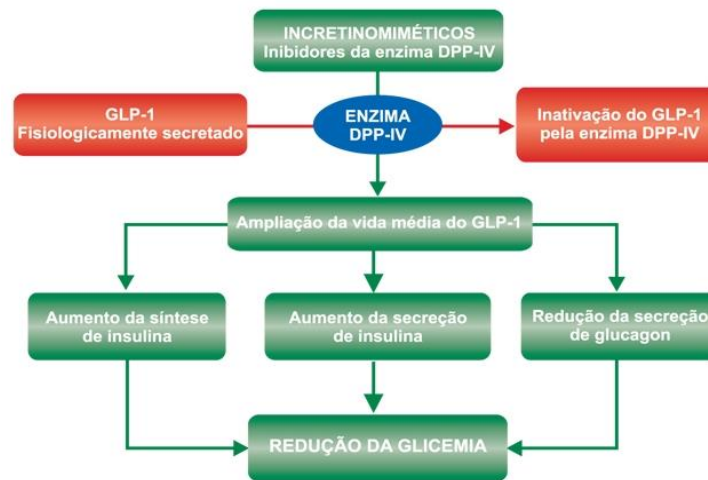
A vildagliptina (Figura 3.2) é indicada na União Europeia e em outras partes do mundo para o controle da DM-2 em combinação com metformina, sulfonilureia ou tiazolidinediona em pacientes com controle glicêmico inadequado pela utilização de monoterapia e já está disponível, no mercado, em combinação com metfomina (CROXTALL & KEAM, 2008; BOLLI *et al.*, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2010).

Figura 3.2. Estrutura química da vildagliptina.



A vildagliptina é um rápido e seletivo inibidor da DPP-4, enzima que é responsável pela inativação das incretinas hormonais, peptídeo 1 semelhante ao *glucagon* (GLP-1) e polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase da glicose. O fármaco melhora a hiperglicemia principalmente, prolongando a meia-vida de GLP-1 e GIP e reforçando, assim, sua ação sobre as células das ilhotas pancreáticas, promovendo a secreção de insulina dependente de glicose e suprimindo a secreção inadequada de *glucagon* (Figura 3.3). Além disso, parece atenuar o declínio da função das células β dependentes de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina aumentando, também, a sensibilidade das células- α para glicose (CROXTALL & KEAM, 2008, EMEA, 2007).

Figura 3.3. Mecanismo de ação dos inibidores da DPP-4.
(Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012)



A vildagliptina é rapidamente absorvida com uma biodisponibilidade oral absoluta de 85%. Os metabólitos são a principal rota de eliminação em humanos, totalizando 69% da dose. O principal metabólito, LAY151, é farmacologicamente inativo e é um produto de hidrólise do grupamento ciano da molécula, correspondendo a 57% da dose, seguido pelo produto da hidrólise da amida (4% da dose) (ANVISA, 2014a).

3.2.5. Associação entre vildagliptina e cloridrato de metformina

A terapia com vildagliptina em combinação com metformina é muito interessante, pois essas substâncias possuem mecanismos de ação complementares. A metformina reduz a produção hepática de glicose e melhora a sensibilidade à insulina, enquanto que a vildagliptina aumenta os níveis de GLP-1 estimulando a secreção de insulina e inibindo a secreção de glucagon (FILOZOF & GAUTIER, 2009).

A associação de cloridrato de metformina, que aumenta a absorção de glicose nos tecidos periféricos e reduz a gliconeogênese hepática, com vildagliptina oferece uma abordagem terapêutica racional para o tratamento da DM-2 (YARDIMCI & ÖZALTIN, 2005; HENNESS & KEAM, 2006), ou seja, não aumenta o risco de hipoglicemia e não promove ganho de peso, um dos efeitos adversos comuns em outras combinações de antidiabéticos orais (GALLWITZ, 2007; GALLWITZ, 2010).

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

A utilização de métodos analíticos é fundamental para que o controle de qualidade possa garantir segurança, eficácia e qualidade totais para um determinado medicamento (GOROG, 2007).

A capacidade de um método analítico deve ser demonstrada de forma a garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Para isso, o método deve ser validado adequadamente para garantir a adequabilidade da metodologia para sua finalidade (ROZET *et al.*, 2007).

Atualmente os órgãos reguladores do Brasil e de muitos outros países exigem a validação de metodologias analíticas para registro de novos produtos e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Para que um estudo de validação seja conduzido com sucesso, é necessário que se tenha amplo conhecimento da legislação, referente aos fármacos em estudo, e das diretrizes propostas pelas agências reguladoras que atuam na área em questão juntamente com um bom planejamento da técnica a ser adotada. Os parâmetros fundamentais para se avaliar o desempenho analítico são especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2013; BAJAJ *et al.*, 2012).

3.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é o método analítico 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).

Esta técnica garante a separação de substâncias que compõem uma mistura contanto que se possua um detector apropriado para permitir a identificação e determinação quantitativa dos compostos. A base da separação consiste nas diferenças de afinidade dos componentes da mistura com a fase estacionária e a fase móvel (KUCHARSKA & GRABKA, 2010).

A espectrometria de massas em combinação com a CLAE (CLAE/EM) tornou-se o principal método de análise de misturas em pesquisa e desenvolvimento farmacêuticos. Neste contexto, a caracterização estrutural de impurezas e produtos de degradação é parte integrante do desenvolvimento de produtos farmacêuticos. A CLAE/EM combina a alta resolução da CLAE juntamente com a detecção e a capacidade de caracterização do espectrômetro de massas (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Avanços recentes em métodos de ionização e espectrômetros de massas resultaram na utilização dessa poderosa técnica no estudo de fármacos. O interesse da cromatografia líquida acoplada a um detector de massas se justifica principalmente pela falta de um detector universal para CLAE. Geralmente, sua aplicação é orientada para a determinação e identificação de fármacos em misturas complexas (JENA, 2011).

3.3.2. Eletroforese capilar (EC)

A EC é uma técnica de separação extremamente útil para análises de pequenas moléculas, especialmente compostos farmacêuticos, além de proteínas, vitaminas, compostos orgânicos e inorgânicos, substâncias quirais e muitos outros. Atualmente é uma das técnicas mais importantes para a separação de moléculas que possuam carga (VON BROCKE *et al.*, 2001).

Essa técnica está sendo utilizada como uma alternativa ao uso da CLAE e vem tornando-se uma poderosa ferramenta na indústria farmacêutica com ampla gama de aplicações como a quantificação de fármacos e impurezas relacionados, a determinação de propriedades físicoquímicas (pK_a , $\log P$ e solubilidade), ou ainda, na determinação de parâmetros farmacocinéticos. Uma das vantagens em relação à CLAE é a capacidade de separar tanto moléculas ionizadas quanto neutras (SUNTORNUSUK, 2007; SERRA *et al.*, 2010).

A separação eletroforética baseia-se na migração diferenciada dos compostos em um campo elétrico e possui diversas classificações dependendo do modo de separação empregado. Dentro do contexto farmacêutico, pode-se ressaltar a utilização da eletroforese capilar de zona (CZE – *capillary zone electrophoresis*) e da

cromatografia eletrocínética micelar (MEKC – *micellar electrokinetic chromatography*) (SUNTORNUSUK, 2010).

3.3.3. Espectrofotometria UV derivada

Os métodos espectrofotométricos são as técnicas comumente e mundialmente utilizadas na análise de fármacos em formulações farmacêuticas e nos ensaios de dissolução devido a sua sensibilidade e custo. A disponibilidade de instrumentação, a simplicidade dos procedimentos e a velocidade das análises são as principais características que fazem dessa técnica uma excelente opção (ROJAS & OJEDA, 2009; ATTIMARAD *et al.*, 2012).

A espectrofotometria derivada permite aplicações onde a técnica de espectrofotometria no UV clássica não pode ser utilizada. De um modo geral, a diferenciação de um espectro de ordem zero para obtenção de espectros de derivada permite a separação de picos sobrepostos, aumentando a seletividade, sem separação prévia dos compostos. Geralmente, um aumento na sensibilidade da determinação é obtido com um aumento na ordem da derivada (KARPINSKA, 2004; EL-SAYED & EL-SALEM, 2005; GAO *et al.*, 2010).

Essa técnica tem sido utilizada como ferramenta no controle de qualidade para análises quantitativas na área farmacêutica oferecendo soluções analíticas nas interferências espectrais que podem ocorrer nas análises. Os métodos de UV derivada permitem a utilização de comprimentos de onda de maior ou menor dependendo do tipo de interferência observada. Com essa possibilidade, é possível selecionar um comprimento de onda específico para as melhores respostas lineares obtidas, o que permite a determinação de cada composto individualmente mesmo na presença de outros compostos ou excipientes da formulação. Ainda, pode-se utilizar essa técnica na análise de produtos de degradação mostrando-se como método indicativo de estabilidade (ROJAS & OJEDA, 2009; CIELECKA-PIONTEK & JELINSKA, 2010; CIELECKA-PIONTEK *et al.*, 2010; HEGAZI *et al.*, 2012).

3.4. ESTABILIDADE DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

O principal objetivo do teste de estabilidade farmacêutica é fornecer garantia razoável de que os produtos permanecerão em um nível aceitável de qualidade durante todo o período que eles estiverem disponíveis no mercado para fornecimento aos pacientes e vai estar apto para o consumo até que o paciente utilize a última unidade do produto (BAJAJ *et al.*, 2012).

Estudos de estabilidade são realizados para estabelecer as condições de armazenamento e o prazo de validade para medicamentos. É um procedimento de rotina realizado na matéria-prima e nos produtos acabados sendo empregado em diferentes fases do desenvolvimento de produtos. Nos estágios iniciais, os testes de estabilidade acelerada são utilizados para determinar o tipo de produtos de degradação que podem ser encontrados após um longo período de armazenamento. Nesses testes, os produtos farmacêuticos e fármacos são submetidos às condições de degradação térmica, hidrólise ácida e alcalina, decomposição oxidativa e fotolítica. Os estudos confirmatórios de longa duração são realizados de modo a verificar as características físicas, químicas e biológicas do produto durante e após o prazo de validade esperado (KLICK *et al.*, 2005; SEHRAWAT *et al.*, 2010; BAJAJ *et al.*, 2012).

Um método indicativo de estabilidade é definido como um método analítico que é capaz de quantificar e detectar a diminuição do fármaco quando da existência de algum tipo de degradação. Para adequada implementação do método indicativo de estabilidade é importante conduzir estudos de degradação forçada e avaliar cada condição com o desenvolvimento de uma metodologia analítica apropriada e devidamente validada (SEHRAWAT *et al.*, 2010).

3.5. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

Os testes de dissolução *in vitro* desempenham um papel importante na pesquisa e desenvolvimento de formulações assim como na produção e no controle de qualidade das mesmas. Esses testes podem ser utilizados não somente como ferramenta fundamental para monitorar a estabilidade de medicamentos, mas também como uma técnica relativamente rápida e economicamente acessível para prever a absorção *in vivo* de uma formulação (MARQUES & BROWN, 2002).

A velocidade de dissolução está associada à absorção do fármaco pelo organismo, interferindo na biodisponibilidade e na correlação *in vitro/in vivo* (CIVIV) (STORPIRTIS, 2009). Com relação à absorção, os parâmetros fundamentais que controlam a taxa e a extensão, para medicamentos de administração oral, são a solubilidade aquosa e permeabilidade gastrintestinal dos mesmos. Sendo assim, com base nesses parâmetros, os fármacos são classificados em quatro classes biofarmacêuticas, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB): Classe 1 (alta solubilidade e alta permeabilidade), Classe 2 (baixa solubilidade e alta permeabilidade), Classe 3 (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e Classe 4 (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) (AMIDON *et al.*, 1995; LINDENBERG *et al.*, 2004).

Na literatura pesquisada não é descrita a classificação biofarmacêutica para a VLG, no entanto, esta possui alta solubilidade e biodisponibilidade (85%) podendo ser sugerida sua classificação biofarmacêutica como de Classe 1. Já a metformina é pertencente à Classe 3 de acordo com artigos encontrados na literatura (CHENG *et al.*, 2004; KASIM *et al.*, 2004; LINDENBERG *et al.*, 2004; WU & BENET, 2005; FLISZAR & FOSTER, 2008; DAHAN *et al.*, 2009; KAWABATA *et al.*, 2011, CRISON *et al.*, 2012).

Portanto, os testes de dissolução para avaliação quantitativa das características de dissolução dos fármacos é de grande interesse para os pesquisadores (ZHANG *et al.*, 2010). A necessidade de realizar o ensaio de dissolução em um método analítico validado representa um fator de extrema relevância para garantir a confiabilidade dos dados obtidos e assegurar a qualidade do fármaco (AUGSBURGER & HOAG, 2007). O fato de um determinado medicamento cumprir as exigências dos órgãos oficiais para a dissolução proporciona uma maior segurança no sentido de que esse fármaco será liberado, *in vivo*, de modo satisfatório a partir de sua forma farmacêutica e que será absorvido adequadamente (AULTON, 2005).

3.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DE VILDAGLIPTINA E METFORMINA

Com relação à literatura analítica envolvendo a vildagliptina foram encontrados alguns trabalhos como os de:

- El-Bagary e colaboradores (2011a) que publicaram método de espectrofotometria no UV para determinação tanto de sitagliptina quanto de vildagliptina, em insumo farmacêutico e comprimidos;
- Mohammad e colaboradores (2012) que realizaram a determinação simultânea de vildagliptina e saxagliptina e, também, em associação com metformina em comprimidos por CLAE-UV;
- Moneeb (2013) utilizou para a determinação de VLG e saxagliptina métodos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos em matéria-prima e comprimidos;
- Boovizhikanna e Palanirajan (2013) para a quantificação de VLG em matéria-prima e comprimidos por CLAE-UV;
- Barden e colaboradores para a determinação de vildagliptina em comprimidos por CLAE (2012) e a determinação quantitativa de vildagliptina e metformina por EC (2013);
- Abdel-Ghany (2014) que realizou a determinação quantitativa de vildagliptina e metformina por métodos espectrofotométricos em comprimidos.

Com relação à literatura analítica envolvendo a metformina foram encontrados trabalhos como os de:

- Wang e colaboradores (2004) que efetuaram a quantificação da metformina em plasma utilizando CLAE acoplada à espectrometria de massas. O método foi aplicado na determinação do perfil de concentração *versus* tempo em um estudo de farmacocinética clínica numa formulação contendo metformina em comprimidos de liberação modificada;
- Amini e colaboradores (2005) que realizaram a determinação da metformina em plasma humano por CLAE;
- Fliszar e Foster (2008) examinaram a taxa de dissolução de três diferentes formulações contendo metformina. Eles desenvolveram um sistema de membrana *in vitro* para medida da permeação com o objetivo de prever como mudanças na formulação poderiam influenciar o desempenho *in vivo* de um fármaco;

- Al-Rimawi (2009) que realizou o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE/UV para a determinação de metformina e de sua impureza relacionada, 1-cianoguanidina;
- Hamdan e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade para a determinação quantitativa de metformina em comprimidos utilizando EC de zona;
- El-Bagary e colaboradores (2011b) contendo a validação por cromatografia líquida de sitagliptina em mistura ternária com metformina e em associação somente com metformina (SHYAMALA *et al.*, 2011; RIAD *et al.*, 2012);
- Kupkar e Yadhav (2012) que publicaram método espectrofotométrico por UV para determinação simultânea de sitagliptina e metformina em matéria-prima e produto acabado;
- Salim e colaboradores (2012) que realizaram a determinação quantitativa de sitagliptina em associação com metformina por eletroforese capilar de zona e aplicaram para análises em comprimidos e plasma humano;
- Cumar e colaboradores (2012) que publicaram um estudo para quantificação de saxagliptina e metformina em comprimidos por CLAE;
- Kavitha e colaboradores (2013) que publicaram método analítico quantitativo por CLAE para metformina em associação com linagliptina.

Apesar de existirem alguns métodos quantitativos para determinação de metformina, não foram encontrados métodos qualitativos, quantitativos e ensaios de dissolução relacionados com a sua determinação ou liberação em associação com outro hipoglicemiante oral como a vildagliptina.

No que se refere à análise quantitativa existente na literatura pesquisada foram encontrados trabalhos referentes à determinação de vildagliptina em comprimidos porém associada a outros hipoglicemiantes orais ou com metformina por métodos espectrofotométricos.

4. CAPÍTULO I: DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

4.1. INTRODUÇÃO

Várias metodologias e técnicas analíticas podem ser utilizadas para identificação de fármacos em produtos acabados. Cabe ao analista selecionar o tipo de técnica mais adequado avaliando-se tanto as características das substâncias a serem analisadas, suas propriedades físicas e químicas, quanto a disponibilidade dos equipamentos no laboratório.

A técnica cromatográfica está entre as principais técnicas utilizadas para a identificação de fármacos. A CLAE, utilizada na identificação de compostos, realiza a comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução padrão do mesmo fármaco. A utilização de um detector de arranjo de fotodiodos (PDA) permite, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos. Essa técnica geralmente oferece alta resolução e possui a capacidade de identificar quantidades pequenas de substância (USP, 2013).

Na EC a identificação do fármaco na amostra de comprimidos é realizada através da comparação do tempo de migração da solução amostra com a solução padrão do fármaco. Da mesma forma que na CLAE, é possível caracterizar a pureza do pico eletroforético e sua identificação, através da análise do espectro gerado pelo detector de arranjo de fotodiodos acoplado ao equipamento. Assim, tempos de migração e perfis eletroforéticos semelhantes, podem sugerir a mesma identidade entre as soluções analisadas.

Nas técnicas de CLAE-EM/EM e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-EM) é possível a identificação dos fármacos com alto nível de seletividade a partir da seleção de íons caracterizando, assim, uma determinada substância. Da mesma forma que nas outras técnicas analíticas, pode-se comparar os resultados obtidos da solução amostra com a solução padrão.

O objetivo do presente capítulo foi realizar a determinação qualitativa pelas técnicas de CLAE, EC, CLAE-EM/EM e CLUE-EM para a análise de vildagliptina em comprimidos e para a análise de vildagliptina associada à metformina em comprimidos

revestidos visando a identificação dessas substâncias nas suas formas farmacêuticas finais.

4.2. PRODUTOS FARMACÊUTICOS

O padrão de referência de vildagliptina, com pureza declarada de 99,5%, foi adquirido através de importação pela empresa Sequoia Researched Products (Reino Unido). O padrão de referência de cloridrato de metformina (pureza de 98,5%) foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para a realização das análises foram empregados comprimidos de Galvus[®] contendo 50 mg de vildagliptina e comprimidos revestidos de GalvusMet[®] contendo 50 mg e 500 mg de vildagliptina e cloridrato de metformina, respectivamente. Ambos produtos foram fabricados pela empresa Novartis Biociências S.A. e adquiridos no comércio local.

Os excipientes presentes na formulação de Galvus[®] são: lactose, celulose microcristalina, amidoglicolato de sódio e estearato de magnésio (ANVISA, 2014a).

Os excipientes presentes na formulação de GalvusMet[®] são: povidona, estearato de magnésio, croscarmelose sódica, dióxido de silício, hipromelose, dióxido de titânio e macrogol (ANVISA, 2014b).

4.3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

4.3.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.3.1.1. 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 *LCSolution* foi utilizado para o controle e aquisição dos dados.

Os componentes das fases móveis foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de *nylon* com diâmetro de poro de 0,45 µm. Após estabilização

do sistema cromatográfico tanto as soluções padrões quanto as soluções amostras foram filtradas previamente em membrana de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo.

4.3.1.1.1. *Análise qualitativa de vildagliptina*

As condições cromatográficas definidas para a identificação da VLG em comprimidos estão apresentadas na Tabela 4.1.

As amostras foram preparadas utilizando na primeira diluição água e, na segunda diluição, fase móvel. Para a extração dos fármacos das formas farmacêuticas, as misturas iniciais foram mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos e posteriormente filtradas. Tanto a solução padrão de vildagliptina quanto a solução amostra, utilizando-se os comprimidos de Galvus[®], foram analisadas na concentração final de 50,0 µg/mL.

Tabela 4.1 Condições cromatográficas empregadas para identificação de VLG nos comprimidos por CLAE.

| Parâmetro | Descrição |
|------------------|--|
| Fase móvel | Tampão Fosfato de Potássio pH 7,0 : Acetonitrila (85:15 v/v) |
| Coluna | Zorbax Eclipse Plus C ₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) |
| Vazão | 1,0 mL/min |
| Temperatura | 25 °C |
| Detecção | 207 nm |
| Volume injeção | 20 µL |

4.3.1.1.2. *Análise qualitativa de vildagliptina e cloridrato de metformina*

As condições cromatográficas definidas para a identificação da VLG e da MET em comprimidos revestidos estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Condições cromatográficas empregadas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por CLAE.

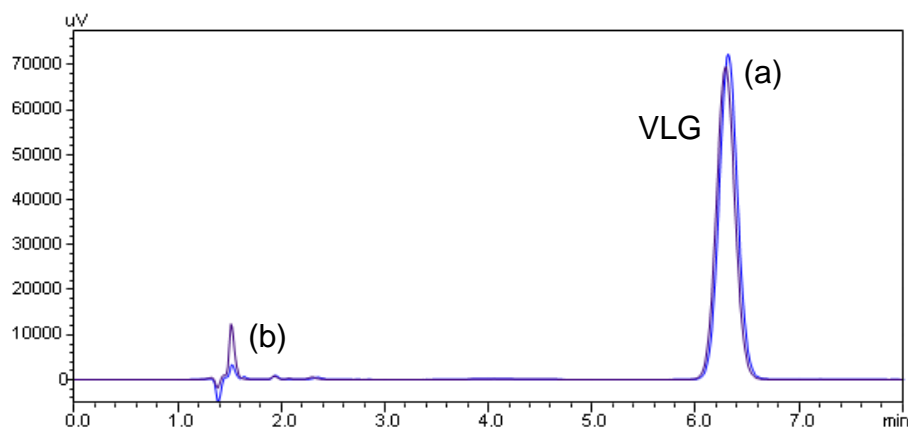
| Parâmetro | Descrição |
|------------------|--|
| Fase móvel | Acetonitrila : Metanol: Heptanossulfonato de sódio 5mM pH 3,0 (18:1:81 v/v) |
| Coluna | Zorbax Eclipse Plus C ₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) |
| Vazão | 1,0 mL/min |
| Temperatura | 25 °C |
| Detecção | 207 nm (VLG) e 250 nm (MET) |
| Volume injeção | 20 µL |

As amostras foram preparadas utilizando na primeira diluição água e, na segunda diluição, fase móvel. Para a extração dos fármacos da forma farmacêutica, as soluções iniciais foram mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos e posteriormente filtradas. Tanto as soluções padrões quanto a solução amostra (obtida a partir dos comprimidos de GalvusMet[®]) foram analisadas nas concentrações finais de 10 µg/mL e 100 µg/mL de VLG e MET, respectivamente.

4.3.1.1.3. Resultados e Discussão

Os cromatogramas sobrepostos das soluções padrão e amostra dos comprimidos de vildagliptina estão apresentados na Figura 4.1.

Figura 4.1 Cromatogramas sobrepostos do padrão de VLG (a) e da solução amostra dos comprimidos de VLG (b) a 50,0 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de solução de fosfato de potássio pH 7,0 : acetonitrila (85:15, v/v), vazão de 1,0 mL/min, coluna Zorbax Eclipse Plus C₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 25 °C, detecção em 207 nm e volume de injeção de 20 µL.



Os cromatogramas sobrepostos das soluções padrões de VLG e MET e amostra dos comprimidos contendo vildagliptina e cloridrato de metformina estão apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3, respectivamente.

A análise simultânea dos fármacos foi realizada através do monitoramento por PDA, dos comprimentos de onda em 207 nm e 250 nm, para a vildagliptina e para o cloridrato de metformina, respectivamente. Optou-se por utilizar dois comprimentos de onda diferentes devido ao alargamento de pico e à dificuldade de se obter adequada simetria para o cloridrato de metformina no comprimento de onda de determinação da vildagliptina em 207 nm e em comprimentos de onda abaixo de 250 nm. Desta forma, parâmetros de adequabilidade do sistema (fator de capacidade, fator de cauda e número de pratos teóricos) foram alcançados para ambos os picos nos comprimentos de onda selecionados para as análises (Tabela 4.3).

Figura 4.2 Cromatogramas sobrepostos do padrão de VLG (a) e da solução amostra dos comprimidos de VLG e MET (b) a 100,0 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de solução de heptanossulfonato de sódio pH 3,0 : acetonitrila : metanol (81:18:1, v/v/v), vazão de 1,0 mL/min, coluna Zorbax Eclipse Plus C₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 25 °C, detecção em 207 nm e volume de injeção de 20 µL.

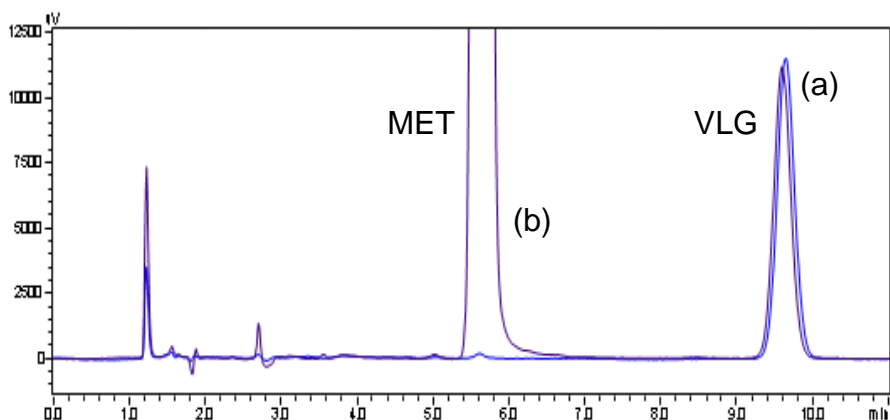
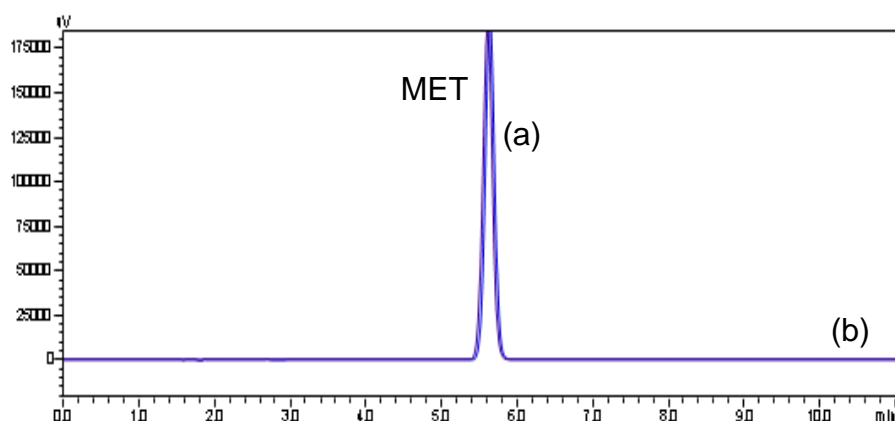


Figura 4.3 Cromatogramas sobrepostos do padrão de MET (a) e da solução amostra dos comprimidos de VLG e MET (b) a 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel constituída de solução de heptanossulfonato de sódio pH 3,0 : acetonitrila : metanol (81:18:1, v/v/v), vazão de 1,0 mL/min, coluna Zorbax Eclipse Plus C₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 25 °C, detecção em 250 nm e volume de injeção de 20 µL.



A semelhança entre os tempos de retenção obtidos tanto para a determinação qualitativa de vildagliptina nos comprimidos de Galvus[®] quanto para a determinação qualitativa da vildagliptina e do cloridrato de metformina nos comprimidos revestidos de GalvusMet[®] demonstram a adequabilidade do método desenvolvido por CLAE.

Tabela 4.3. Parâmetros de adequabilidade do sistema encontrados para VLG (207 nm) e MET (250 nm) por CLAE.

| Parâmetro | Preconizado (USP 36, 2013) | Valores obtidos (207 nm) | Valores obtidos (250 nm) |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Fator de capacidade | $k' > 2$ | 12,354 | 3,722 |
| Precisão/repetibilidade | $DPR \leq 1\%$ ($n \geq 5$) | $DPR = 0,23\%$ ($n=6$) | $DPR = 0,14\%$ ($n=6$) |
| Fator de cauda | $T \leq 2$ | $T = 1.10$ | $T = 1,22$ |
| Número pratos teóricos | $N > 2000$ | $N = 54344$ | $N = 12134$ |

As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam a sobreposição dos espectros de absorção na região do ultravioleta (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do ápice dos picos para a solução padrão de VLG e amostra e para a solução padrão de MET e amostra, respectivamente.

Figura 4.4 Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do padrão e da amostra de vildagliptina por CLAE.

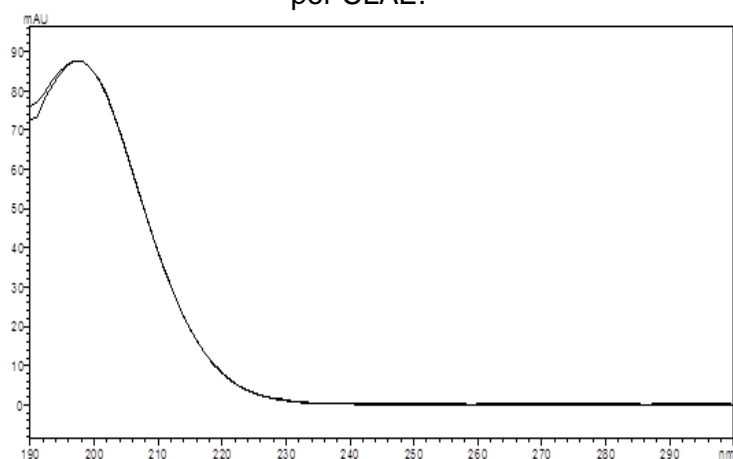
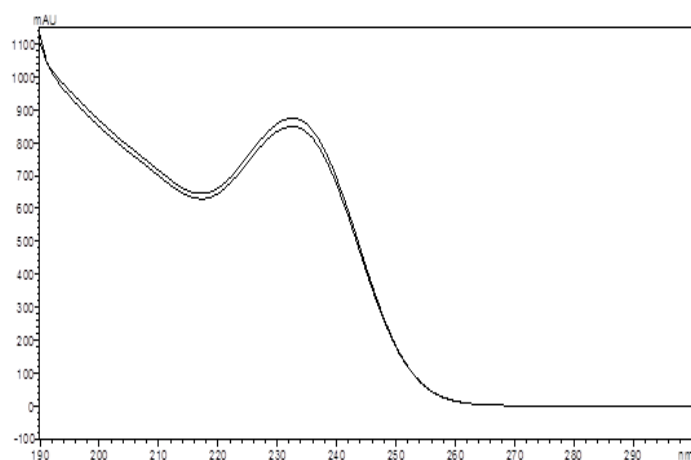


Figura 4.5 Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do padrão e da amostra de cloridrato de metformina por CLAE.



4.3.2. Eletroforese capilar (EC)

4.3.2.1. Condições eletroforéticas

Os experimentos por EC foram realizados em equipamento Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies) equipado com injetor automático, DAD e controlador de temperatura. O programa CE *ChemStation* foi utilizado para controle do sistema e tratamento de dados.

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

4.3.2.1.1. Análise qualitativa de vildagliptina

Para a análise qualitativa da VLG nos comprimidos foi empregado o modo de separação por eletroforese capilar de zona (CZE) utilizando cloridrato de ranitidina como padrão interno. As condições eletroforéticas empregadas estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Condições eletroforéticas empregadas para identificação de VLG nos comprimidos por EC.

| Parâmetro | Descrição |
|-----------------------|--|
| Capilar | Capilar de sílica fundida 64,5 cm (56 cm efetivos, 50 µm diâmetro interno) |
| Eletrólito | Tampão fosfato 25 mM pH 8,0 |
| Tensão aplicada | 25 kV |
| Temperatura | 25 °C |
| Comprimento de onda | 207 nm |
| Injeção hidrodinâmica | 50 mBar |
| Tempo de injeção | 5 segundos |
| Padrão interno | Cloridrato de ranitidina |

As soluções foram obtidas a partir da diluição em água tanto do padrão de VLG, padrão de cloridrato de ranitidina quanto da solução amostra dos comprimidos. A solução amostra dos comprimidos foi colocada para extração em banho de ultrassom durante 10 minutos e após foram filtradas com auxílio de papel filtro. As concentrações finais foram de 100 µg/mL.

O eletrólito de corrida foi constituído por fosfato de potássio dibásico 25 mM diluído em água e pH ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio 1,0 M. A solução final foi filtrada em uma membrana de 0,45 µm com a utilização de seringa.

4.3.2.1.2. Análise qualitativa de vildagliptina e cloridrato de metformina

Para a análise qualitativa da VLG e da MET nos comprimidos revestidos foi empregado o modo de separação por eletroforese capilar de zona (CZE) utilizando cloridrato de ranitidina como padrão interno. As condições eletroforéticas empregadas estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Condições eletroforéticas empregadas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por EC.

| Parâmetro | Descrição |
|-----------------------|--|
| Capilar | Capilar de sílica fundida 72,5 cm (64 cm efetivos, 50 µm diâmetro interno) |
| Eletrólito | Tampão tetraborato 25 mM pH 9,0 |
| Tensão aplicada | 25 kV |
| Temperatura | 25 °C |
| Comprimento de onda | 207 nm (VLG) e 250 nm (MET) |
| Injeção hidrodinâmica | 50 mBar |
| Tempo de injeção | 5 segundos |
| Padrão interno | Cloridrato de ranitidina |

As soluções foram preparadas com diluição em água tanto do padrão de VLG, padrão de MET e de cloridrato de ranitidina quanto da solução amostra dos comprimidos revestidos e as concentrações finais obtidas foram de 50 µg/mL, 500 µg/mL e 100 µg/mL para as soluções de VLG, MET e cloridrato de ranitidina. A solução amostra dos comprimidos revestidos foi colocada para extração em banho de ultrassom durante 10 minutos e após foram filtradas com auxílio de papel filtro.

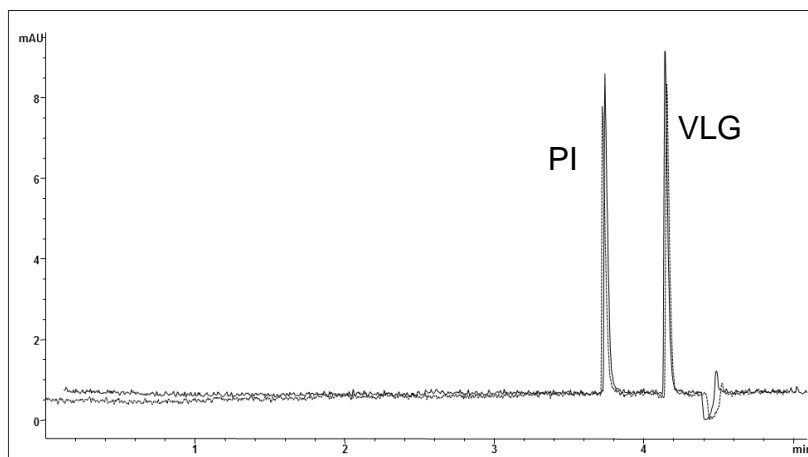
Para a preparação do eletrólito de corrida foi pesada quantidade equivalente a 25 mM de tetraborato de sódio decaidratado que foi diluído em água. O pH foi ajustado para 9,0 com hidróxido de sódio 1,0 M. A solução final foi filtrada com auxílio de seringa em uma membrana de 0,45 µm.

4.3.2.1.3. Resultados e Discussão

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 CZE demonstrou ser adequado para a análise qualitativa do vildagliptina em comprimidos e de vildagliptina e cloridrato de metformina em comprimidos revestidos.

Na Figura 4.6 podemos observar os eletroferogramas sobrepostos da soluções padrão e amostra dos comprimidos de vildagliptina.

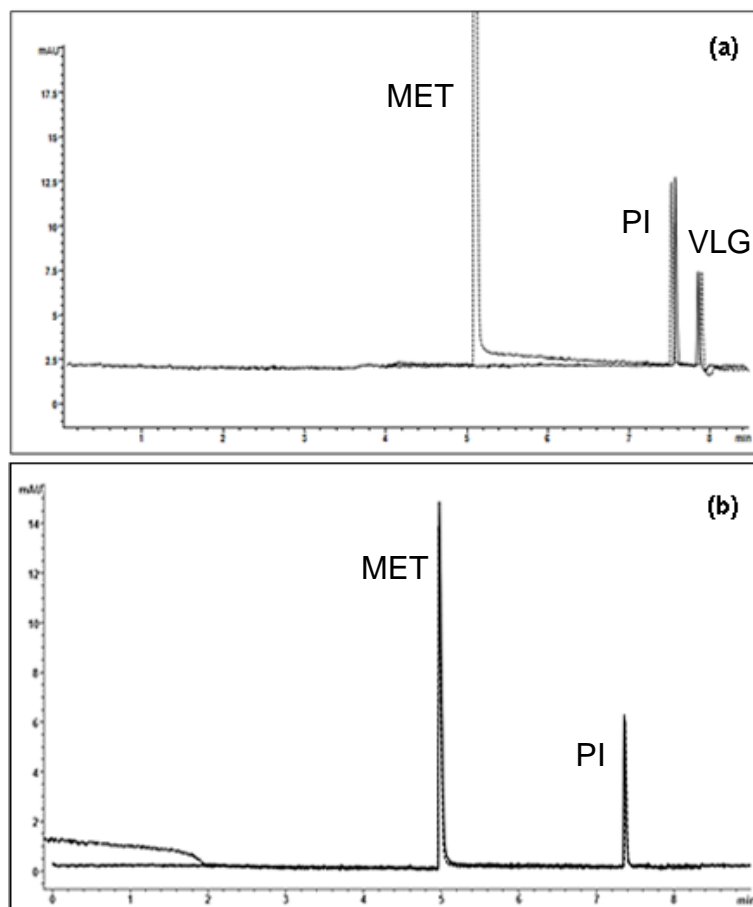
Figura 4.6 Sobreposição dos eletroferogramas obtidos para a solução padrão e amostra de vildagliptina por CZE



Nas Figuras 4.7a e 4.7b os eletroferogramas sobrepostos das soluções padrões de VLG e MET e amostra dos comprimidos contendo vildagliptina e cloridrato de metformina, respectivamente.

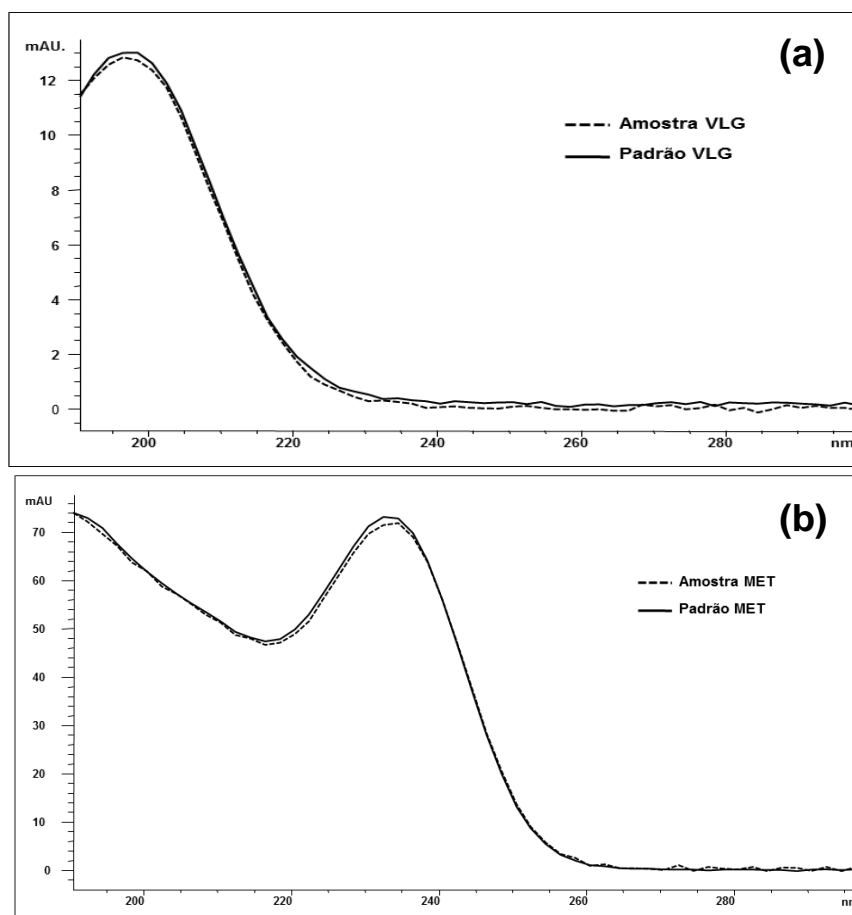
Da mesma forma que nas análises realizadas por CLAE, os comprimentos de onda selecionados para a determinação dos fármacos estudados foram de 207 nm para vildagliptina e de 250 nm para o cloridrato de metformina, tendo em vista as melhores condições obtidas para determinação dos fármacos nesses comprimentos de onda.

Figura 4.7 Sobreposição dos eletroferogramas obtidos para a solução padrão de VLG e amostra de vildagliptina e cloridrato de metformina por CZE em 207 nm (a) e sobreposição dos eletroferogramas obtidos para a solução padrão de MET e amostra de vildagliptina e cloridrato de metformina por CZE em 250 nm (b).



As Figuras 4.8a e 4.8b apresentam a sobreposição dos espectros de absorção na região do ultravioleta (190 a 300 m) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do ápice dos picos para a solução padrão de VLG e amostra e para a solução padrão de MET e amostra, respectivamente.

Figura 4.8 Sobreposição dos espectros de absorção no UV (190 a 300 nm) obtidos com detector de arranjo de fotodiodos do padrão e da amostra de vildagliptina (a) e do padrão e da amostra de metformina (b) obtidos por EC.



4.3.3. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

4.3.3.1. Condições cromatográficas

As análises por CLAE-EM/EM foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com controlador de sistema SCL10-ADvp, bomba quaternária LC-10ADvp, degaseificador DGU-14A, forno CTO-10ACvp e autoinjeter SIL-10ADvp. O cromatógrafo foi acoplado ao espectrômetro de massas triplo quadrupolo Micromass, modelo Quattro LC, equipado com uma fonte de ionização de eletronebulização. O programa utilizado para operar o equipamento foi o Masslynx versão 3.5.

As condições cromatográficas e os parâmetros utilizados para identificação de VLG e MET por CLAE-EM/EM estão apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Condições cromatográficas e parâmetros do espectrômetro de massas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por CLAE-EM/EM.

| Parâmetro | Descrição |
|---------------------------|--|
| Fase móvel | acetonitrila : ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v) |
| Vazão | 0,45 mL/min |
| CLAE Coluna | Agilent® Zorbax Eclipse C ₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) |
| Temperatura forno | 30 °C |
| Volume injeção | 10 µL |
| Tipo de ionização | Eletronebulização positiva |
| Modo de operação | Monitoramento de reações múltiplas (MRM) |
| Transições monitoradas | <i>m/z</i> 303,8>153,4 (VLG) <i>m/z</i> 129,4>70,8 (MET) <i>m/z</i> 252,7>158,4 (PI) |
| Voltagem do capilar | 2,85 kV |
| EM Voltagem do cone | 30 V |
| Voltagem do extrator | 2 V |
| Energia de colisão | 20 eV |
| Temperatura da fonte | 120 °C |
| Temperatura de solvatação | 350 °C |

Os componentes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de *nylon* com diâmetro de poro de 0,45 µm. Após estabilização do sistema cromatográfico tanto as soluções padrões quanto as soluções amostras foram filtradas previamente em membrana de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.

As soluções padrão e amostra filtradas para ambas as substâncias foram preparadas em água, filtradas e diluídas até a concentração de 2 µg/mL em metanol:água (50:50, v/v).

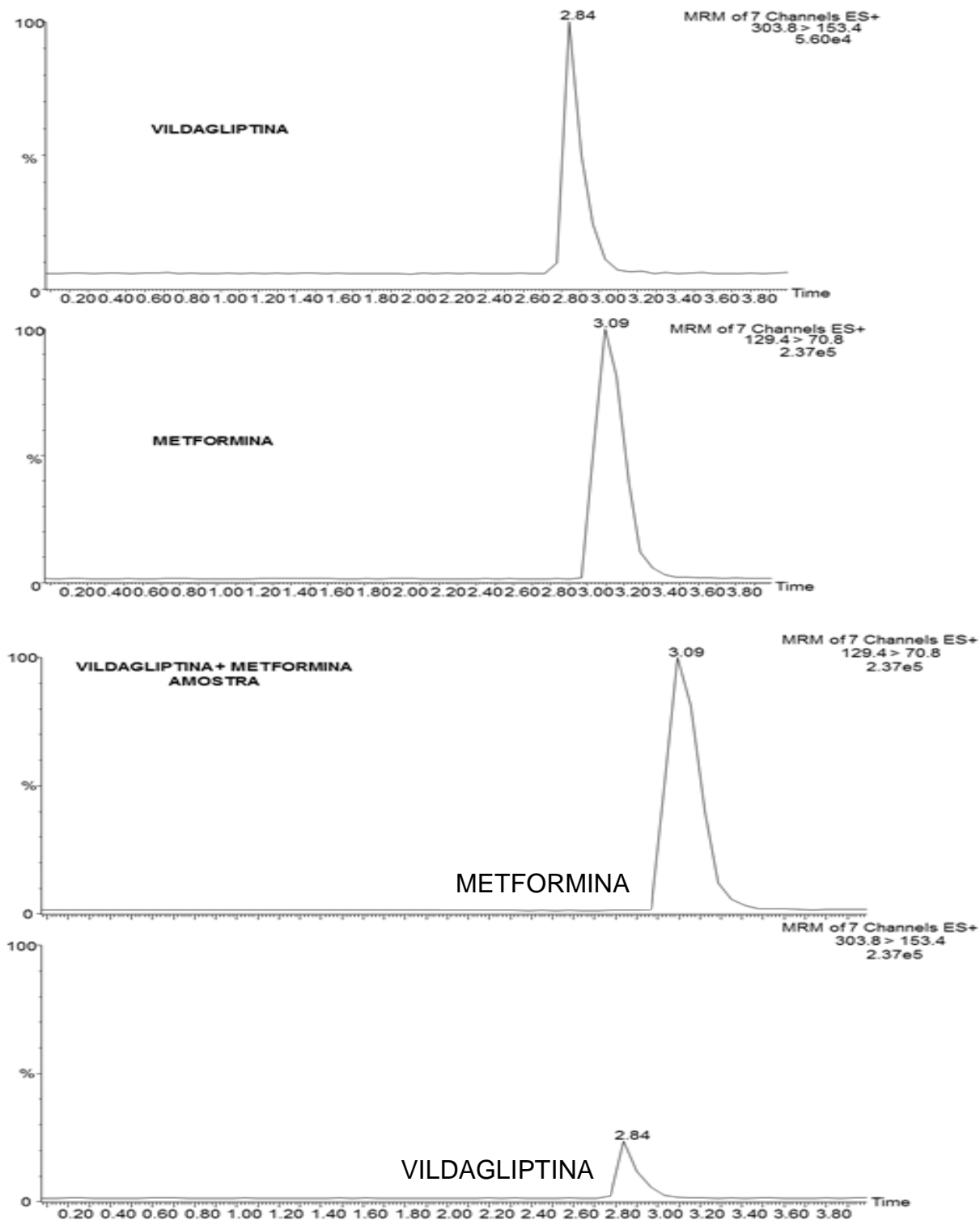
A identificação dos fármacos nos comprimidos revestidos foi realizada detectando VLG e MET por meio da transição específica dos íons principais para os íons secundários e também por comparação do tempo de retenção das amostras com seus respectivos padrões.

4.3.3.1.1. Resultados e discussão

O modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) é um procedimento que utiliza íons de relação m/z onde um quadrupolo analisa o íon principal enquanto que o outro quadrupolo analisa o íon secundário.

Para a determinação de VLG foi monitorada a transição do íon principal (m/z 303,8) para o íon secundário (m/z 153,4), tanto para a solução padrão quanto para a solução amostra. As proximidades entre os tempos de retenção demonstraram a aplicabilidade do método para a determinação qualitativa de VLG. Da mesma forma, a determinação de MET foi monitorada a partir da transição do íon principal (m/z 129,4) para o íon secundário (m/z 70,8) e a aplicabilidade do método também foi comprovada para a análise qualitativa de MET. Os cromatogramas das soluções padrões de VLG e MET e de amostra de VLG e MET estão apresentadas na Figura 4.9.

Figura 4.9. Cromatogramas CLAE-EM/EM das soluções padrão e amostra de VLG e MET na concentração de 2 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel composta de acetonitrila : ácido fórmico 0,1% (80:20, v/v), vazão de 0,45 mL/min, coluna Agilent C₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), temperatura de 30 °C, volume de injeção de 10 µL. Análise espectral de massas: ionização por eletronebulização positiva, operação no modo MRM, nas transições monitoradas de 303,8>153,4 e 129,4>70,8.



4.3.4. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

4.3.4.1. Condições cromatográficas

As análises por CLUE-UV/EM foram realizadas em cromatógrafo a líquido UPLC Waters® Acquity acoplado com espectrômetro de massas, Micromass Q-TOF, equipado com ionização por eletronebulização no modo positivo. O programa utilizado para análise dos dados e controle do sistema foi o Masslynx versão 4.1.

As condições cromatográficas e os parâmetros utilizados para identificação de VLG e MET por CLUE-EM estão apresentadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Condições cromatográficas e parâmetros do espectrômetro de massas para identificação de VLG e MET nos comprimidos revestidos por CLUE-EM.

| Parâmetro | Descrição |
|---------------------------|---|
| Fase móvel | ácido fórmico 0,1% : acetonitrila (95:5, v/v) |
| Vazão | 0,35 mL/min |
| CLUE Coluna | Acquity HSS T3 Waters® (50 mm x 2,1 mm; 1,8 µm) |
| Temperatura forno | 30 °C |
| Volume injeção | 2 µL |
| Tipo de ionização | Eletronebulização positiva |
| Voltagem do capilar | 2,5 kV |
| Voltagem do cone | 30 V |
| EM Voltagem do extrator | 3 V |
| Energia de colisão | 25 eV |
| Temperatura do bloco | 120 °C |
| Temperatura de solvatação | 200 °C |

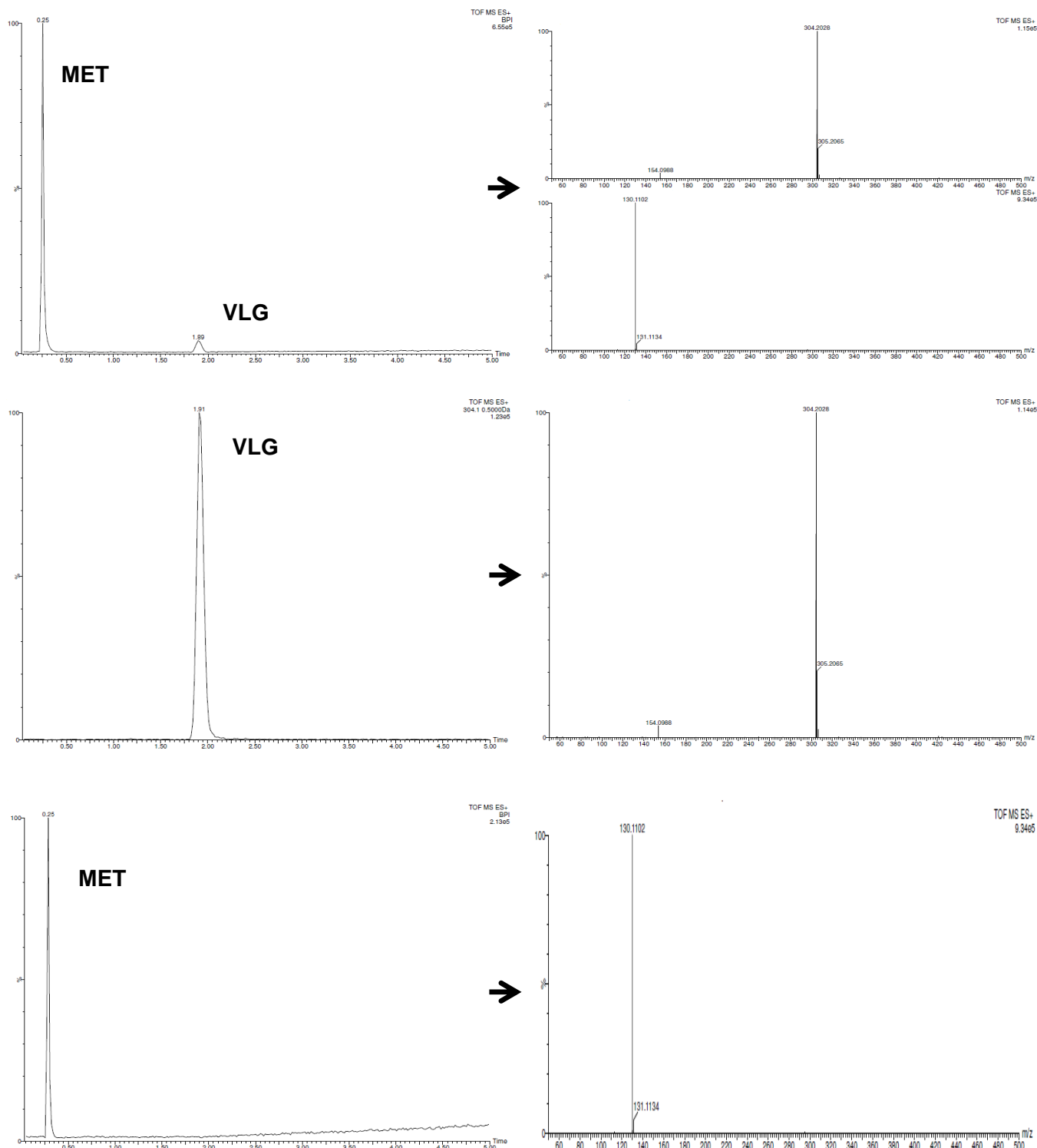
As soluções padrão e amostra foram preparadas da mesma forma que as descritas no item 4.3.3.1.

4.3.4.1.1. Resultados e discussão

Os cromatogramas obtidos das soluções padrão e amostra, para VLG e MET, estão apresentados na Figura 4.10. Os íons principais foram previamente selecionados de acordo com a relação m/z 304,2 $[M+H]^+$ e m/z 130,1 $[M+H]^+$ para VLG e MET, respectivamente. Os tempos de retenção encontrados para VLG e MET padrão foram 1,71 minutos e 0,37 minutos, respectivamente.

Os resultados encontrados mostram que tanto a detecção dos íons principais quanto o tempo de retenção similar entre as respectivas soluções padrão e amostra para cada fármaco são adequadas demonstrando a aplicabilidade do método de CLUE-EM para a análise qualitativa de VLG e MET em comprimidos revestidos.

Figura 4.10. Cromatogramas CLUE-EM das soluções padrão e amostra de VLG e MET na concentração de 2 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel composta de acetonitrila : ácido fórmico 0,1% : acetonitrila (95:5, v/v), vazão de 0,35 mL/min, coluna Acquity HSS T3 Waters® (50 mm x 2,1 mm; 1,8 µm), temperatura de 30 °C, volume de injeção de 2 µL. Análise espectral de massas: ionização por eletronebulização positiva, monitorados os íons m/z 304,1 (VLG) e m/z 130,1 (MET).



4.4. DISCUSSÃO

Os resultados qualitativos encontrados nas amostras analisadas, quando comparados àqueles obtidos pelos padrões de referência de cada substância, permitem a identificação dos fármacos nos comprimidos revestidos. Os métodos que foram desenvolvidos nesse trabalho empregaram as técnicas de CLAE, EC, CLAE-EM/EM e CLUE-EM. Esses métodos além de desenvolvidos foram validados, o que permite a realização de análises tanto qualitativas quanto quantitativas com qualidade e confiança nos resultados obtidos.

4.5. CONCLUSÕES

Pela observação dos cromatogramas obtidos por CLAE, CLAE-EM/EM e CLUE-EM foi possível realizar a identificação da VLG em comprimidos e da VLG e MET em comprimidos revestidos. Tanto os padrões de VLG e de MET quanto as amostras dos comprimidos contendo somente VLG e dos comprimidos revestidos contendo VLG e MET apresentaram cromatogramas semelhantes. Dessa forma, as técnicas desenvolvidas permitiram a identificação dos fármacos nos produtos farmacêuticos demonstrando estarem de acordo com a proposta pretendida.

Os resultados obtidos pelos métodos eletroforéticos desenvolvidos para a VLG e para a VLG em associação com a MET apresentaram tempos de migração similares para os sinais analíticos encontrados das soluções padrões de VLG e MET e para as soluções amostra de comprimidos e de comprimidos revestidos. Foram encontrados espectros semelhantes na região do ultravioleta nos tempos de migração permitindo, dessa forma, a identificação dos compostos nas formas farmacêuticas estudadas.

Os métodos desenvolvidos por CLAE, EC, CLAE-EM/EM e CLUE-EM permitiram a identificação seletiva de cada um dos compostos. Esses métodos são considerados adequados para a identificação dos fármacos nas formas farmacêuticas embora, em determinadas situações, seja necessária a utilização de mais de uma técnica para obter resultados de maior confiabilidade.

**5. CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA, ESTUDOS DE ESTABILIDADE,
IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E CITOTOXICIDADE**

5. CAPÍTULO II: DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA, ESTUDOS DE ESTABILIDADE, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E CITOTOXICIDADE

5.1. INTRODUÇÃO

A utilização de métodos analíticos confiáveis é a base para a obtenção de dados de elevada qualidade. Dessa forma, a qualidade de um método analítico depende em grande parte do seu desenvolvimento e complementarmente da sua validação. Somente a validação pode demonstrar a qualidade inerente da metodologia analítica mediante o cumprimento dos critérios mínimos de aceitação e, então, provar sua aplicabilidade para uma determinada proposta (PETERS *et al.*, 2007).

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico do método contemplam as exigências para a aplicação analítica pretendida. Os estudos para validação dos métodos analíticos devem ser realizados de acordo com os principais códigos oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Além disso, quando necessário, são avaliados os limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2013).

Para atingir o objetivo de se avaliar a estabilidade de formulações farmacêuticas, o método analítico deve ser considerado indicativo de estabilidade, ou seja, que demonstre adequada capacidade de separar e, se possível, identificar os produtos de degradação formados. Com base nisso, estudos forçados de degradação e de especificidade devem ser realizados de modo a demonstrar a seletividade do procedimento analítico. Para tanto, submete-se o fármaco a diversas condições de estresse tais como temperaturas elevadas, oxidação, fotólise e hidrólise em ampla faixa de pH demonstrando, assim, que o método pode ser utilizado para quantificar as substâncias formadas, se houver, nessas condições (ICH, 2005; BRASIL, 2005; ALSANTE *et al.*, 2007; SHABIR *et al.*, 2007).

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.

Além disso, é um procedimento bastante versátil pois confere a possibilidade de variação dos mecanismos de separação através de escolha adequada da coluna cromatográfica, fase móvel e modo de detecção, permitindo sua utilização nas mais diversas fases de desenvolvimento de produtos farmacêuticos (WATSON, 2005, SHABIR *et al.*, 2007).

A técnica de CLAE-EM/EM permite a análise de mais de um composto em baixos níveis com alta sensibilidade, seletividade e especificidade e, ainda, com excelente eficiência na quantificação e rápido tempo de análise. Essa técnica possibilita a elucidação estrutural de impurezas e produtos de degradação, facilitando esse processo sem a necessidade de um isolamento prévio para identificação de produtos de degradação (MEHTA *et al.*, 2010; VYAS *et al.*, 2010; BAJAJ *et al.*, 2012).

A EC é uma técnica que vem sendo reconhecida como alternativa confiável em relação aos tradicionais métodos analíticos utilizados, como a CLAE. A EC está sendo vista como uma área de rápida evolução analítica onde melhorias e desenvolvimentos significativos estão sendo continuamente relatados (ALTRIA & ELDER, 2004; FROST *et al.*, 2010).

A EC é um poderoso método analítico com significativa importância na separação de substâncias em formulações farmacêuticas ou em matrizes biológicas, devido ao seu mecanismo de separação único, velocidade, eficiência e versatilidade. Em geral, quando comparada à CLAE, as separações por EC podem ser alcançadas rapidamente e de maneira altamente eficiente sem a necessidade de um pré-tratamento da amostra. Outras vantagens incluem consumo muito baixo, ou até mesmo a ausência, de solvente orgânico, pequena quantidade de reagentes necessários, bem como a utilização de capilares simples de sílica fundida, ao invés da utilização das colunas cromatográficas com custo muito elevado (SUNTORNUSUK, 2010; RAMAUTAR *et al.*, 2010).

A determinação quantitativa de vildagliptina em comprimidos e de vildagliptina em associação com o cloridrato de metformina em comprimidos revestidos foi realizada utilizando a CLAE, EC e CLAE-EM/EM, apresentados nesse trabalho na forma de artigos científicos.

As validações das metodologias para as duas formulações por CLAE (VLG e MET) e UV derivada (VLG) estão descritas no Capítulo III juntamente com os ensaios de dissolução para as respectivas formas farmacêuticas.

5.2. ARTIGO CIENTÍFICO: CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF VILDAGLIPTIN (A DPP-4 INHIBITOR) IN PHARMACEUTICAL FORMULATION AND COMPARATIVE STUDY WITH HPLC

Pharmazie, v. 69, p. 86-91, 2014

5.2. CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF VILDAGLIPTIN (A DPP-4 INHIBITOR) IN PHARMACEUTICAL FORMULATION AND COMPARATIVE STUDY WITH HPLC

Barden AT¹, Piccoli BL¹, Volpato NM¹, Steppe M¹

¹*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil*

5.2.1. RESUMO

Método indicativo de estabilidade por eletroforese capilar de zona foi validado para a determinação de vildagliptina (VLG) em comprimidos usando cloridrato de ranitidina como padrão interno. As condições eletroforéticas utilizadas foram: capilar de sílica fundida de 50 µm de diâmetro interno e 64 cm de comprimento (56 cm de comprimento efetivos), corrente de 25 kV, injeção hidrodinâmica por pressão de 50 mbar por 5 s e temperatura do capilar de 25 °C. O eletrólito de corrida selecionado consistiu de solução tampão fosfato de potássio 25 mM com detecção UV em 207 nm. A separação eletroforética foi obtida em 6 minutos de corrida e foi linear na faixa de 50-200 µg/mL ($r = 0,9994$). A especificidade e a capacidade indicativa de estabilidade foram demonstradas através de estudos de degradação forçada os quais demonstraram não haver interferência dos excipientes da formulação farmacêutica. O método foi validado de acordo com os critérios de aceitação das guias internacionais para especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e adequabilidade do sistema. O método proposto foi comparado com um método por CLAE previamente validado para esse fármaco e a análise estatística demonstrou não haver diferenças significativas entre os dois métodos avaliados.

Palavras-chave: eletroforese capilar de zona; vildagliptina; método indicativo de estabilidade; cromatografia líquida de alta eficiência; validação.

5.3. ARTIGO CIENTÍFICO: SIMULTANEOUS ASSAY METHOD BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR A FIXED DOSE COMBINATION OF VILDAGLIPTIN AND METFORMIN HYDROCHLORIDE IN COATED TABLETS

Analytical Methods, v. 5, p. 5701-5708, 2013

5.3. SIMULTANEOUS ASSAY METHOD BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR A FIXED DOSE COMBINATION OF VILDAGLIPTIN AND METFORMIN HYDROCHLORIDE IN COATED TABLETS

Barden AT¹, Piccoli BL¹, Volpato NM¹, Steppe M¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

5.3.1. RESUMO

No presente estudo, validou-se um rápido e confiável método por eletroforese capilar de zona para a determinação simultânea de vildagliptina (VLG) e metformina (MET) em comprimidos revestidos. A separação dos fármacos foi alcançada utilizando-se um capilar de sílica fundida onde aplicou-se uma corrente de 25 kV e injeção hidrodinâmica com pressão de 50 mbar durante 5 s. O eletrólito de corrida utilizado foi uma solução tetraborato de sódio decahidratado 25 mM (pH 9,0) com detecção na região do UV em 207 nm e 250 nm para VLG e MET, respectivamente. Especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez foram estabelecidos de acordo com as orientações das guias internacionais. A especificidade e a capacidade indicativa de estabilidade foram estabelecidas através de estudos de degradação forçada combinado com avaliação da pureza dos picos eletroforéticos usando detecção por arranjo de fotodiodos. A separação eletroforética foi alcançada dentro de 10 minutos e o método foi linear na faixa de 30-60 µg/mL e 300-600 µg/mL para VLG e MET, respectivamente ($R^2 > 0,9980$). A precisão do método foi demonstrada por DPRs abaixo de 2,95% e resultados de exatidão próximos a 100% tanto para valores de VLG quanto de MET. Ainda, utilizou-se um desenho experimental por Plackett-Burman para avaliação da robustez do método, produzindo resultados dentro dos limites de aceitação preconizados.

Palavras-chave: eletroforese capilar de zona; desenho experimental; vildagliptina; metformina; determinação simultânea; validação.

5.4. ARTIGO CIENTÍFICO: QUANTITATIVE DETERMINATION, IDENTIFICATION OF VILDAGLIPTIN AND METFORMIN DEGRADATION PRODUCTS BY LC-MS/MS AND CYTOTOXICITY IN VITRO ASSAY

Submetido para publicação

5.4. QUANTITATIVE DETERMINATION, IDENTIFICATION OF VILDAGLIPTIN AND METFORMIN DEGRADATION PRODUCTS BY LC-MS/MS AND CYTOTOXICITY IN VITRO ASSAY

Amanda T. Barden¹, Sarah Campanharo¹, Maiara C. Pigatto², Fabiano Barreto³, Juliana M. M. Andrade⁴, Matheus A. G. Nunes⁵, Edson I. Müller⁵, Érico M. M. Flores⁵, Nadia M. Volpato¹, Martin Steppe¹

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga 2752, Lab. 402, F: 55-51-3308-5214 Porto Alegre, RS, Brazil*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga 2752, Centro Bioanalítico de Medicamentos, F: 55-51-3308-5499 Porto Alegre, RS, Brazil*

³*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS, Porto Alegre, RS, Brazil*

⁴*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Av. Ipiranga 2752, Lab. 505-H, F: 55-51-3308-5258 Porto Alegre, RS, Brazil*

⁵*Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria.
Av. Roraima nº 1000, Prédio 18 - Camobi, F: 55-51-3220-9445 Santa Maria, RS, Brazil*

5.4.1. RESUMO

Para a análise simultânea de vildagliptina (VLG) e metformina (MET) em sua forma farmacêutica combinada foi desenvolvido e validado um método sensível e específico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de

massas sequencial (CLAE-EM/EM). As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna Agilent® C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) e fase móvel composta de acetonitrila e 0,1% ácido fórmico (80:20, v/v) eluída sob uma vazão de 0,45 mL/min. O volume de injeção utilizado foi de 10 µL tanto para os padrões como para as amostras. O espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo utilizou a ionização por electrospray positivo sendo configurado no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM), monitorando as transições de m/z 303,8>153,4 (vildagliptina), m/z 129,4>70,8 (metformina) and m/z 252,7>158,4 (cimetidina – padrão interno). O tempo total de análise foi de 3 minutos e o método mostrou-se linear na faixa de 100-1000 ng/mL para vildagliptina e de 1000-10000 ng/mL para metformina. A validação do método foi avaliada investigando-se parâmetros, tais como, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, obtendo-se resultados em conformidade com os limites internacionalmente preconizados. Ainda, outro método por CLAE-EM/EM foi desenvolvido e utilizado para avaliação dos produtos de degradação encontrados nas condições as quais os fármacos foram mais suscetíveis. A partir desse método, foi possível a obtenção de um produto de degradação com m/z 154,04 correspondente à degradação oxidativa de vildagliptina e outro produto de degradação com m/z 102,1 foi encontrado para a metformina tanto em condições de degradação ácidas como térmicas. Cabe salientar que os dois produtos de degradação encontrados (um para VLG e outro para a MET) são os primeiros descritos na literatura científica pelo nosso grupo de pesquisa. As amostras degradadas também foram estudadas para determinar a citotoxicidade preliminar *in vitro* utilizando-se células mononucleares humanas. Os resultados indicaram que tanto os fármacos quanto seus produtos de degradação não alteram a membrana celular podendo, assim, ser considerados não tóxicos para as células humanas nas condições experimentais testadas.

Palavras-chave: vildagliptina; metformina; validação; CLAE-EM/EM; produtos de degradação; citotoxicidade.

5.5. DISCUSSÃO

A adoção de medidas para a verificação da qualidade dos medicamentos deve ser uma preocupação constante uma vez que existe um crescente desenvolvimento de novos fármacos e produtos farmacêuticos pelas indústrias farmacêuticas.

Sendo assim, o controle de qualidade é uma ferramenta imprescindível para a indústria farmacêutica, pois a partir dele pode-se garantir a obtenção de medicamentos mais eficazes, seguros, menos tóxicos e mais estáveis em todas as etapas do desenvolvimento e fabricação de medicamentos.

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

Os agentes hipoglicemiantes, vildagliptina e cloridrato de metformina, utilizados para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 e pertencentes às classes dos inibidores da enzima dipeptidil peptidase IV e biguanidinas, respectivamente possuem grande importância terapêutica principalmente por não causarem hipoglicemia e aumento de peso como em outras classes de hipoglicemiantes orais.

Uma grande parte dos medicamentos que são comercializados ainda não possui métodos analíticos públicos descritos para suas análises. A vildagliptina não apresenta monografia em códigos oficiais e existe uma carência na literatura pesquisada em relação à análise quantitativa para sua determinação comprimidos. Em relação à determinação quantitativa da sua associação com o cloridrato de metformina, fármaco utilizado há bastante tempo para o tratamento da diabetes mellitus, em comprimidos revestidos também não foram encontrados relatos na literatura pesquisada. Devido à indisponibilidade de métodos que atentem à qualidade das formas farmacêuticas comercializadas, os objetivos desse trabalho contemplam o desenvolvimento e validação de métodos analíticos qualitativos e quantitativos, ensaios de dissolução e estudo de estabilidade.

No desenvolvimento das técnicas por eletroforese capilar, inúmeros ajustes foram feitos até que fosse possível estabelecer as condições ideais para as análises. A composição do eletrólito, voltagem aplicada, dimensões do capilar, temperatura de

análise, modo e tempo de injeção da amostra e comprimento de onda de detecção foram alguns dos parâmetros considerados durante o desenvolvimento dos métodos analíticos.

A eletroforese capilar em zona livre foi primeiramente testada e apresentou resultados satisfatórios em todas as análises realizadas. Utilizou-se então, para a análise de VLG em comprimidos, o tampão fosfato de potássio monobásico a um pH de 8,0. A última diluição da amostra foi feita em água, pois ocorreu uma diminuição considerável e significativa na intensidade do pico da VLG quando utilizou-se tampão na diluição final. Para a análise da VLG e da MET em comprimidos revestidos utilizou-se tampão tetraborato de sódio com pH 9,0. A última diluição também foi realizada em água e as análises foram realizadas em dois comprimentos de onda diferentes. Para a VLG utilizou-se o comprimento de onda em 207 nm e para a MET o comprimento de onda em 250 nm. Analisando o espectro de UV da VLG, apresenta somente um comprimento de onda de máxima absorção (207 nm) e, por isso, foi considerada a única possibilidade de quantificação nesse comprimento de onda. A MET possui mais de um comprimento de onda para a quantificação e, nesse caso, optou-se pelo comprimento de onda de menor absorção (250 nm), devido à melhor simetria e intensidade de pico encontradas nessa condição. Após o teste de proporcionalidade, entre vários fármacos como padrão interno, para ambos os métodos, o cloridrato de ranitidina foi escolhido, já que este fármaco apresenta boa absorção tanto no comprimento de onda de 207 nm quanto no comprimento de onda de 250 nm. O padrão interno foi utilizado para minimizar a variação do sistema de injeção e garantir a boa reprodutibilidade do método eletroforético. Testou-se também a cromatografia capilar eletrocínica micelar (MECK) com o intuito de melhorar o perfil dos picos e a intensidade do sinal da VLG, porém não foram encontrados picos nas análises realizadas utilizando diferentes eletrólitos, pHs e proporções de tensoativos.

A partir dos resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de validação foi possível confirmar que os métodos desenvolvidos por EC foram validados adequadamente nas formas farmacêuticas avaliadas. As técnicas também possibilitaram a identificação qualitativa dos fármacos e a determinação na presença de produtos de degradação sugerindo a aplicação das metodologias para

monitoramento da estabilidade dos fármacos nas suas respectivas formas farmacêuticas.

Os estudos de degradação forçada realizados por EC proporcionaram o conhecimento dos principais fatores de degradação e a validação de métodos indicativos de estabilidade. Durante esta fase de desenvolvimento do método analítico objetivou-se a degradação entre 5 a 20% do fármaco, evitando degradações muito drásticas (ALSANTE, 2007).

As curvas de pureza obtidas para os picos de vildagliptina e de cloridrato de metformina, obtidos nas diferentes condições de degradação, demonstraram a seletividade do método por EC, indicando que mesmo na presença de prováveis produtos de degradação, o método apresenta seletividade suficiente para quantificar os fármacos de interesse.

Ainda, os resultados do método desenvolvido e validado por EC para a determinação de VLG em comprimidos foram comparados estatisticamente com os resultados de quantificação obtidos pelo nosso grupo de pesquisa pelo método CLAE-UV (BARDEN *et al.*, 2012). Os resultados foram avaliados pelo teste *t* de Student presumindo variâncias equivalentes. A análise estatística demonstrou que não ocorreram diferenças significativas entre os mesmos para um nível de confiança de 95% indicando haver equivalência entre os métodos propostos na determinação quantitativa de VLG em comprimidos.

A CLAE-EM/EM é bastante utilizada para a identificação de produtos de degradação e vem sendo gradativamente inserida na indústria farmacêutica, porém o equipamento possui custo elevado de aquisição e manutenção e existe ainda a necessidade de pessoal qualificado para operá-lo. Nesse trabalho, essa técnica foi utilizada com o intuito de proporcionar uma alternativa à CLAE-UV no controle de qualidade de medicamentos e também com a finalidade de identificar produtos de degradação. Para tal, no desenvolvimento do método vários parâmetros foram cuidadosamente estabelecidos como: a otimização do espectrômetro para uma maior sensibilidade para detecção dos dois compostos estudados selecionando as transições adequadas e mais abundantes de íons dos padrões de VLG e MET e do PI. Diferentes colunas cromatográficas foram testadas, entre elas, colunas C₈ e C₁₈. A coluna empregada foi uma C₈ de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Os solventes testados para a escolha da fase móvel foram os mais

comumente utilizados em análises com detecção por espectrometria de massas por possuírem características de volatilidade e de adequada ionização dos analitos de interesse, como o ácido fórmico e o acetato de amônio, em diferentes concentrações e proporções em combinação com solventes orgânicos. O método proposto e validado nesse trabalho cumpriu os requisitos preconizados pela literatura para análises qualitativas e quantitativas de ambos fármacos hipoglicemiantes estudados.

O estudo de estabilidade de VLG e MET foi realizado por meio da degradação forçada a qual cada um dos fármacos foi suscetível. De acordo com os resultados de especificidade obtidos por EC e por CLAE (demonstrado no Capítulo II) ocorreu degradação da VLG nas condições básica, oxidativa e térmica enquanto que a degradação da MET foi mais favorecida nas condições ácida, básica e térmica. As degradações escolhidas para efetuar a identificação dos produtos de degradação foram aquelas as quais houve um decréscimo significativo no teor de VLG e MET e o aparecimento de pelo menos um produto de degradação majoritário no cromatograma, ou seja, na condição oxidativa para VLG e nas condições ácida e térmica para a MET. Após a realização das degradações, procedeu-se a análise por CLAE-EM/EM para a separação dos fármacos de seus produtos de degradação. Foi necessário desenvolver dois métodos analíticos diferentes (um para VLG e outro para MET) para conseguir a adequada separação dos picos e seus degradados. A partir disso, e pelo adequado monitoramento dos íons mais estáveis, foi possível a identificação de um produto de degradação para a VLG e de outro produto de degradação para a MET, sendo o mesmo produto obtido nas condições ácida e térmica. O produto de degradação majoritário obtido para a VLG (m/z 154.1) na condição oxidativa confirma os resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Com relação ao produto de degradação obtido para a MET (m/z 102.1), não existem dados na literatura referentes à identificação de produtos de degradação sendo o nosso trabalho o primeiro relacionado a esse assunto.

Ainda, realizou-se o teste de citotoxicidade para avaliação tanto dos fármacos sem degradação quanto de seus produtos de degradação encontrados. Esse teste avalia o dano à membrana celular, em células mononucleares humanas. Se a substância em análise possuir considerável potencial citotóxico ocorre o rompimento da membrana celular e a posterior liberação de lactato desidrogenase (LDH) intracelular. Nos testes realizados tanto para os padrões e amostra dos fármacos

VLG e MET sem degradação quanto para os mesmos com degradação, no tempo e concentrações avaliados, foi possível verificar que não houve extravasamento de LDH intracelular e, conseqüentemente, os fármacos não revelaram potencial citotóxico.

5.6. CONCLUSÕES

- ◆ Os métodos desenvolvidos por EC nas condições experimentais estabelecidas, mostraram-se específicos, lineares, precisos, exatos e robustos nas análises quantitativas de vildagliptina em comprimidos e da associação de vildagliptina e cloridrato de metformina em comprimidos revestidos.
- ◆ Os métodos validados por EC foram considerados indicativos de estabilidade pois permitiram a diferenciação dos produtos de degradação obtidos dos fármacos em estudo;
- ◆ O método quantitativo desenvolvido por CLAE-EM/EM foi satisfatoriamente validado e pode ser utilizado como alternativa na determinação dos fármacos em associação na formulação farmacêutica;
- ◆ O método por CLAE-EM/EM possibilitou a identificação dos íons moleculares de dois produtos de degradação, um para vildagliptina e outro para metformina, permitindo propor a rota de degradação para os fármacos.
- ◆ Os métodos validados por CLAE e EC para a determinação quantitativa de vildagliptina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste *t* de Student, presumindo variâncias equivalentes.
- ◆ No ensaio de citotoxicidade em células mononucleares humanas, as amostras degradadas, nas concentrações de 10-100 µg/mL (VLG), 100-1000 µg/mL (MET) e 10/100-100/1000 µg/mL (VLG/MET) não apresentaram potencial efeito citotóxico.

6. CAPÍTULO III: ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

6.1. INTRODUÇÃO

Os ensaios de dissolução são procedimentos analíticos que avaliam a taxa de liberação de fármacos a partir de suas formas farmacêuticas, geralmente em produtos farmacêuticos sólidos utilizados para a via oral como comprimidos e cápsulas. A liberação da forma farmacêutica, a solubilização sob condições fisiológicas e a permeabilidade através de membranas são fatores que podem limitar a absorção de fármacos após a administração oral de formas farmacêuticas sólidas (QURESHI, 2006).

Os métodos de dissolução são requisitos fundamentais para assegurar a qualidade lote a lote do produto farmacêutico, no desenvolvimento de novos produtos e para garantir a qualidade após mudanças na formulação ou mudanças no processo produtivo (SHARGEL *et al.*, 2005).

Existem alguns fatores que afetam a velocidade de dissolução *in vitro* e devem ser consideradas quando se realiza o desenvolvimento de um método de dissolução. O tamanho da partícula, a solubilidade, a higroscopicidade e a presença de polimorfismo são fatores relacionados ao fármaco. Em relação à forma farmacêutica podemos considerar os excipientes presentes na forma farmacêutica. Quando consideramos o meio de dissolução devemos verificar e ajustar os parâmetros relacionados ao volume do meio, à presença de gases dissolvidos, ao pH e à viscosidade do meio de dissolução. Por fim, devemos considerar as características relacionadas ao equipamento como dispositivo de agitação e velocidade. Todos esses fatores são importantes e podem afetar a velocidade de dissolução dos fármacos em estudo e, por isso, devem ser consideradas (AULTON, 2005).

A seleção das condições do teste de dissolução devem ser planejadas no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de refletir mudanças feitas na formulação, no processo de fabricação, ou nas características físico-químicas do fármaco (MARQUES & BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (porcentagem de

fármaco dissolvido *versus* tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução.

Nenhum dos objetivos dos ensaios de dissolução será alcançado se o método analítico utilizado não for confiável e apresentar, no mínimo, especificidade, robustez, linearidade, precisão e exatidão dos resultados. Antes de prosseguir com a validação do método de dissolução deve-se avaliar a calibração do equipamento a ser utilizado, as condições *sink* e a influência dos filtros (MARQUES & BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003).

Na literatura pesquisada não foram encontrados estudos relacionados à liberação de vildagliptina ou da sua associação com cloridrato de metformina de suas formas farmacêuticas. Assim, foram desenvolvidos e validados dois métodos de dissolução para comprimidos de vildagliptina e comprimidos revestidos contendo vildagliptina em associação com cloridrato de metformina que estão apresentados a seguir na forma de artigos científicos.

**6.2. ARTIGO CIENTÍFICO: SECOND-ORDER DERIVATIVE UV
SPECTROPHOTOMETRIC AND RP-HPLC METHODS FOR THE ANALYSIS OF
VILDAGLIPTIN AND ITS APPLICATION FOR DISSOLUTION STUDY**

Submetido para publicação

6.2. SECOND-ORDER DERIVATIVE UV SPECTROPHOTOMETRIC AND RP-HPLC METHODS FOR THE ANALYSIS OF VILDAGLIPTIN AND ITS APPLICATION FOR DISSOLUTION STUDY

A. T. Barden¹, B. L. Piccoli¹, N. M. Volpato¹, and M. Steppe¹

¹Laboratory of Research in Pharmaceutical Quality Control, Faculty of Pharmacy,
Federal University of Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

6.2.1. RESUMO

Este estudo descreve dois métodos analíticos, por espectrofotometria UV derivada de segunda ordem (2D-UV) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a determinação de vildagliptina, um fármaco utilizado no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2, pertencente à classe terapêutica denominada inibidores da dipeptidil peptidase 4. Os métodos foram validados de acordo com as guias oficiais internacionais. O método de 2D-UV foi utilizado no comprimento de onda de 220 nm, o qual foi o ponto de anulação no qual não houve interferência dos excipientes da formulação, com delta lambda de 8 e fator de escala de 20. O método por CLAE foi otimizado e a análise foi realizada utilizando uma coluna Agilent[®] C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), com detecção em 207 nm, fase móvel constituída de solução tampão fosfato de potássio pH 7,0 e acetonitrila (85:15, v/v) com eluição isocrática de 1,0 mL/min. Para o método de dissolução, alguns parâmetros foram testados até o alcance de condições satisfatórias para execução do método. As condições utilizadas foram meio de dissolução contendo 900 mL de ácido clorídrico 0,01 M, dispositivo pás e velocidade de agitação de 50 rpm. Especificidade, linearidade, precisão e exatidão foram os parâmetros avaliados para a validação do método de dissolução. Os métodos por 2D-UV e por CLAE foram satisfatoriamente aplicados na análise da liberação do fármaco das amostras dos comprimidos de vildagliptina obtidos no comércio.

Palavras-chave: vildagliptina; espectrofotometria UV derivada; CLAE; método de dissolução.

6.3. ARTIGO CIENTÍFICO: STABILITY INDICATING RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION AND IN VITRO DISSOLUTION STUDIES FOR VILDAGLIPTIN AND METFORMIN IN COATED TABLETS

Submetido para publicação

6.3. STABILITY INDICATING RP-HPLC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION AND IN VITRO DISSOLUTION STUDIES FOR VILDAGLIPTIN AND METFORMIN IN COATED TABLETS

Amanda Thomas Barden¹, Bruna L. Piccoli¹, Nádia M. Volpato¹, Martin Steppe¹

¹*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil*

6.3.1. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação simultânea de vildagliptina e metformina em comprimidos revestidos e um método de dissolução para avaliação da liberação dos fármacos para controle de qualidade lote a lote. A determinação simultânea por CLAE foi realizada em dois comprimentos de onda (207 nm para vildagliptina e 250 nm para metformina) para obtenção do teor dos fármacos nos comprimidos e do perfil de liberação dos fármacos a partir da forma farmacêutica avaliada. A análise foi realizada em uma coluna Agilent® C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) com fase móvel composta por heptanossulfonato de sódio pH 3,0 (ajustado com ácido fosfórico), acetonitrile e methanol (81:18:1, v/v), eluição isocrática de 1,0 mL/min e temperatura do forno de 25 °C. Para o estudo de dissolução, a condição *sink* foi estabelecida a partir da solubilidade dos fármacos nos meios de dissolução testados para formulações de liberação imediata. As condições utilizadas foram: meio de dissolução contendo tampão fosfato de potássio dihidrogenado pH 6,8, dispositivo pás com velocidade de agitação em 50 rpm e volume das cubas de 900 mL. Os perfis de liberação para vildagliptina e metformina alcançaram mais do que 98% da quantidade rotulada até 15 minutos. Os métodos de CLAE e dissolução foram validados de acordo com o preconizado pelas guias internacionais para especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

Palavras-chave: vildagliptina; metformina; CLAE; métodos de dissolução.

6.4. DISCUSSÃO

A utilização de métodos analíticos é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade total de um medicamento. São várias as metodologias analíticas que podem ser utilizadas na análise farmacêutica, tais como, técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectrais. Essas técnicas podem ser empregadas e escolhidas de acordo com o tipo de análise que se quer realizar (GÖRÖG, 2007, SHABIR *et al.*, 2007; ROZET *et al.*, 2007).

O método por CLAE, sendo um método de separação, fornece elevada seletividade na identificação de componentes de uma amostra, garantindo a identidade das substâncias desde que haja um padrão de referência de identidade conhecida. Os resultados obtidos por CLAE demonstram que os tempos de retenção para o padrão de vildagliptina e para a VLG presente nos comprimidos são os mesmos, indicando que as amostras possuem as mesmas características e, portanto, a mesma identidade. O mesmo ocorreu com os tempos de retenção dos padrões de VLG e de MET em relação aos tempos de retenção encontrados para os mesmos compostos em associação nos comprimidos revestidos. Além disso, os perfis cromatográficos foram semelhantes em todas as análises realizadas.

Para o desenvolvimento e posterior validação do método para quantificação de VLG por CLAE, vários tipos e proporções de fase móvel foram testadas avaliando-se combinações entre solventes orgânicos e soluções tamponantes em diferentes proporções, na faixa de pH entre 3,0 e 7,0. Para o método proposto empregou-se uma coluna C8 de 15 cm, a qual forneceu um desempenho cromatográfico adequado para o fármaco em estudo. Inicialmente testou-se solução aquosa com pH ajustado a 7,0 com trietilamina, porém, como esse método foi desenvolvido com o intuito de aplicá-lo posteriormente para o estudo de dissolução foi necessário recorrer ao uso de sais para tamponamento da fase móvel. Resultados satisfatórios foram obtidos com a mistura constituída por tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,0 e acetonitrila (85:15, v/v).

Durante o desenvolvimento do método de quantificação da associação de VLG e MET por CLAE foram testados vários tipos de colunas (C8, C18, fenil e ciano), com diferentes comprimentos (10, 15 e 25 cm). Como ambos os fármacos

possuem características polares, a separação foi dificultada em todas as colunas testadas já que, principalmente, o cloridrato de metformina apresentou menor tempo de retenção nas colunas cromatográficas. Foram testadas diferentes composições de fase móvel em ampla faixa de pH (entre 3,0 e 8,0) de acordo com a capacidade de cada coluna. Porém, mesmo assim, não foi possível obter um adequado tempo de retenção e fator de capacidade para a MET. Sendo assim, optou-se por testar fase móvel constituída de sais que possuem a função de pareamento iônico objetivando a maior retenção do fármaco na coluna. Foram testados os sais pentanossulfonato, heptanossulfonato e octanossulfonato de sódio em diferentes proporções de solventes orgânicos e pHs. Uma análise rápida com adequados tempos de retenção para ambos os fármacos, ótimo fator de capacidade e dos demais parâmetros de adequabilidade do sistema foram alcançados utilizando como fase móvel solução aquosa contendo heptanossulfonato de sódio com pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico, acetonitrila e metanol (81:18:1, v/v) com uma coluna C8 de 15 cm. Esse método foi utilizado posteriormente para a avaliação da liberação de VLG e MET em comprimidos revestidos a partir de ensaios de dissolução.

Métodos indicativos de estabilidade são requeridos para monitorar possíveis produtos de degradação que possam surgir devido a interações da substância ativa com os excipientes, no processo de produção, em embalagens e/ou armazenamento inadequado. Esses métodos devem ser robustos e reunir todos os parâmetros de validação requeridos em cada estágio do desenvolvimento e na análise do produto final (BOUABIDI *et al.*, 2010; SEHRAWAT *et al.*, 2010).

Com base no exposto, ressalta-se a importância do método desenvolvido pela capacidade de determinar os fármacos na presença de produtos de degradação sugerindo, assim, que o método pode ser aplicado para verificação da estabilidade dos fármacos nas duas formas farmacêuticas estudadas conforme pode ser observado no item 6.3 do Capítulo III.

Considerando todos os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez, é possível afirmar que os métodos por CLAE foram validados de forma satisfatória para a determinação quantitativa de VLG em comprimidos e para a determinação de VLG e MET em comprimidos revestidos. O teste de dissolução de medicamentos é uma ferramenta largamente empregada pelo controle de

qualidade farmacêutico, sendo de grande utilidade ao setor de desenvolvimento e para acompanhamento da reprodutibilidade lote a lote dos produtos. No desenvolvimento do ensaio de dissolução é importante conhecer a solubilidade e estabilidade do fármaco no meio de dissolução.

Apesar de não ter sido encontrada a classificação biofarmacêutica da VLG, pode-se inferir que o fármaco seja pertencente à Classe I, pois apresentou uma alta solubilidade aquosa e, segundo dados da literatura, possui biodisponibilidade de 85% e alta permeabilidade (EMEA, 2007). Foi realizado, assim, o método de dissolução obtendo-se o perfil de dissolução a fim de conhecer as informações geradas a partir do teste desenvolvido.

Para a realização dos estudos de dissolução realizou-se o desenvolvimento dos métodos de análise. Os métodos utilizados para quantificação foram os desenvolvidos e validados para a VLG por CLAE e 2D-UV. A validação do método por espectrofotometria na região do UV derivada permitiu a determinação quantitativa de uma maneira rápida e precisa e a aplicação direta em testes de dissolução, de extrema importância para o controle de qualidade da vildagliptina nos comprimidos.

A VLG mostrou-se bastante solúvel nos meios testados (HCl 0,01 M e 0,1 M; tampão acetato pH 4,5; tampão acetato pH 6,0 e tampão fosfato pH 6,8) e sua estabilidade foi determinada no meio escolhido, HCl 0,01 M, sendo que o fármaco manteve-se estável por 24 h em temperatura ambiente (25 °C). Para a escolha da velocidade de agitação, foi selecionada a faixa recomendada pela USP 36 para pás (50-75 rpm). No entanto, não foi observada uma diferença significativa nos perfis de liberação do fármaco entre as duas velocidades testadas. Assim, as condições do ensaio de dissolução foram: 900 mL HCl 0,01 M e dispositivo 2 (pás) com velocidade de agitação de 50 rpm.

Para a avaliação da dissolução dos comprimidos revestidos contendo VLG em associação com MET foram testados os meios tampão acetato pH 4,5; tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4. O meio contendo ácido clorídrico não foi testado, pois a MET é suscetível à degradação nesse meio e, portanto, não possui estabilidade. Os fármacos apresentam alta solubilidade nos meios testados e, portanto, alta taxa de liberação no decorrer do tempo. O meio em que se observou ser mais adequado para o controle de qualidade dessa formulação foi o contendo tampão fosfato de

potássio pH 6,8, utilizando pás como dispositivo de agitação na velocidade de 50 rpm. Para avaliação dos perfis de liberação dos fármacos utilizou-se o método desenvolvido e validado por CLAE para a associação de ambos os fármacos em comprimidos revestidos.

Por fim, com o intuito de conferir a intercambiabilidade dos métodos desenvolvidos e validados por CLAE e 2D-UV foi realizada a análise comparativa dos resultados através do teste *t* de Student presumindo variâncias equivalentes. Os resultados demonstraram que não ocorreram diferenças significativas para um nível de confiança de 95% indicando haver equivalência entre os métodos propostos na determinação quantitativa dos fármacos nas duas formas farmacêuticas estudadas.

7. CONCLUSÕES GERAIS

- ◆ Os métodos desenvolvidos por CLAE-UV, CZE-UV, CLAE-EM/EM e CLUE-EM/EM mostraram-se adequados para a identificação dos fármacos nas formulações avaliadas;
- ◆ Os métodos validados por CZE foram capazes de analisar ambos os fármacos, sendo adequadamente validados e considerados indicativos de estabilidade;
- ◆ O método 1 (CLAE-EM/EM) foi validado e permitiu a quantificação simultânea dos fármacos com alta sensibilidade e seletividade;
- ◆ Pelo método 2 (CLAE-EM/EM) foi possível a identificação e separação dos produtos de degradação de cada fármaco, permitindo propor suas estruturas moleculares;
- ◆ O ensaio de citotoxicidade demonstrou não haver dano à membrana celular humana tanto dos fármacos como de seus respectivos produtos de degradação;
- ◆ Os métodos (2D-UV e CLAE-UV) foram validados e utilizados para avaliação da liberação de VLG em comprimidos;
- ◆ O método (CLAE-UV) validado para avaliação da liberação simultânea dos fármacos VLG e MET foi utilizado, demonstrando sensibilidade suficiente para determinação da quantidade dissolvida de cada fármaco no meio de dissolução escolhido;

- ◆ O uso de HCl 0,01M (VLG) e tampão fosfato de potássio pH 6,8 (VLG + MET) como meios de dissolução demonstraram resultados satisfatórios para o controle de qualidade de rotina das formas farmacêuticas avaliadas.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANY, M.F.; ABDEL-AZIZ, O.; AYAD, M.F.; TADROS, M.M. Validation of different spectrophotometric methods for determination of vildagliptin and metformin in binary mixture. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 125, p. 175-182, 2014.

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

ALFONSO, J.E.F.; ARIZA, I.D.S. Nuevas terapias en diabetes: más allá de la insulina inyectable y de los antidiabéticos orales. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 54, n. 5, p. 447-454, 2008.

AL-RIMAWI, F. Development and validation of an analytical method for metformin hydrochloride and its related compound (1-cyanoguanidine) in tablet formulations by HPLC-UV. *Talanta*, v. 79, p. 1368–1371, 2009.

ALSANTE, K.M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T.D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 29-37, 2007.

ALTRIA, K.D.; ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. *Journal of Chromatography A*, v. 1023, p. 1-14, 2004.

AMIDON, G.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlations on in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-419, 1995.

AMINI, H.; AHMADIANI, A.; GAZERANI, P. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 824, p. 319–322, 2005.

AMORI, R.E.; LAU, J.; PITTAS, A.G. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Journal of American Medical Association*, v. 298, n. 2, p. 194-206, 2007.

ANVISA. VILDAGLIPTINA (Bula de medicamento). Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[26126-3-0\].pdf](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[26126-3-0].pdf). Acesso em Janeiro, 2014a.

ANVISA. VILDAGLIPTINA + CLORIDRATO DE METFORMINA (Bula de medicamento). Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[26127-1-0\].pdf](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[26127-1-0].pdf). Acesso em Janeiro, 2014b.

ATTIMARAD, M.; AL-DHUBIAB, B. E.; ALHAIDER, I. A.; NAIR, A. B.; HARSHA, N. S.; AHMED, K. M. Simultaneous determination of moxifloxacin and cefixime by first and ratio first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*, v. 6, n. 105, p. 1-7, 2012.

AUGSBURGER, L. L.; HOAG, S. W. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. 3th ed. Taylor & Francis, Inc., 2007, p. 153-190.

AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 02, n. 03, p. 129-138, 2012.

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

BARDEN, A. T., SALAMON, B., SCHAPOVAL, E. E. S., STEPPE, M. Stability-Indicating RP-LC Method for the Determination of Vildagliptin and Mass Spectrometry Detection for a Main Degradation Product. *Journal of Chromatographic Science*, v. 50, p. 426–432, 2012.

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

BOLEN, S.; FELDMAN, L.; VASSY, J.; WILSON, L.; YEH, H.; MARINOPOULOS, S.; WILEY, C.; SELVIN, E.; WILSON, R.; BASS, E.B.; BRANCATI, F.L. Systematic Review: Comparative Effectiveness and Safety of Oral Medications for Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine*, v. 147, p. 386-399, 2007.

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

BOOVIZHIKANNANA, T.; PALANIRAJAN, V.K. RP-HPLC determination of vildagliptin in pure and in tablet formulation. *Journal of Pharmacy Research*, v. 7, n. 1, p. 113-116, 2013.

BOUABIDI, A.; ROZET, E.; FILLET, M.; ZIEMONS, E.; CHAPUZET, E.; MERTENZ, B.; KLINKENBERG, R.; CECCATO, A.; TALBI, M.; STREEL, B.; BOUKLOUZE, A.; BOULANGER, B., HUBERT, P. Critical analysis os several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 3180-3192, 2010.

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

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

BUSE, J.B.; ROSENSTOCK, J.; SESTI, G.; SCHMIDT, W.E.; MONTANYA, E.; BRETT, J.H.; ZYCHMA, M.; BLONDE, L. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomized, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *Lancet*, v. 274, n. 9683, p. 39-47, 2009.

CAMPBELL, R. K.; WHITE, J. R.; SAULIE, B. A. Metformin: A New Oral Biguanide. *Clinical Therapeutics*, v. 18, n. 3, p. 360-371, 1996.

CHENG, C.; YU, L. X.; LEEC, H.; YANG, C.; LUEE, C.; CHOU, C. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, p. 297-304, 2004.

CIELECKA-PIONTEK, J.; ARAN, L.; JELIŃSKA, A. Stability-indicating derivative spectrophotometry method for the determination of biapenem in the presence of its degradation products. *Central European Journal of Chemistry*, v. 9, n. 1, p. 35-40, 2010.

CIELECKA-PIONTEK, J.; JELINSKA, A. The UV-derivative spectrophotometry for the determination of doripenem in the presence of its degradation products. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 77, p. 554-557, 2010.

CRISON, J. R.; TIMMINS, P.; KEUNG, A.; UPRETI, V. V.; BOULTON, D. W.; SCHEER, B. J. Biowaiver Approach for Biopharmaceutics Classification System Class 3 Compound Metformin Hydrochloride Using In Silico Modeling. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, n. 5, p. 1773-1782, 2012.

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

CUMAR, R. Pravin; VASUDEVAN, M.; DEECARAMAN. A validated RP – HPLC method for simultaneous estimation of metformin and saxagliptin in tablets. *Rasayan Journal of Chemistry*, v. 5, n. 2, p. 137-141, 2012.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; AMIDON, G. L. Prediction of Solubility and Permeability Class Membership: Provisional BCS Classification of the World's Top Oral Drugs. *The AAPS Journal*, v. 11, n. 4, p. 740-746, 2009.

DEL PRATO, S.; PENNO, G.; MICCOLI, R. Changing the treatment paradigm for type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 32, n. 2, S217-S222, 2009.

EL-BAGARY, R. I.; ELKADY, E. F.; AYOUB, B. M. Spectrophotometric Methods for the Determination of Sitagliptin and Vildagliptin in Bulk and Dosage Forms. *International Journal of Biomedical Sciences*, v. 7, n. 1, p. 55-61, 2011a.

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

EL-BAGARY, R.I., ELKADY, E.F.; AYOUB, B.M. Spectrophotometric Methods for the Determination of Linagliptin in Binary Mixture with Metformin Hydrochloride and Simultaneous Determination of Linagliptin and Metformin Hydrochloride using High Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Biomedical Sciences*, v. 9, n. 1, 2013.

EL-SAYED, A. Y.; EL-SALEM, N. A. Recent developments of derivative spectrophotometry and their analytical applications, *Analytical Sciences*, v. 21, p. 595-614, 2005.

EMA, 2007. Disponível em:
<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000771/WC500020330.pdf> Acesso em Março, 2014.

FDA. Food and Drug Administration. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration , 1994.

FDA, 2010. Disponível em:
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm226956.htm>. Acesso em Março, 2014.

FILIZOF, C.; GAUTIER, J.-F. A comparison of efficacy and safety of vildagliptin and gliclazide in combination with metformin in patients with Type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone: a 52-week, randomized study. *Diabetic Medicine*, v. 27, p. 318–326, 2010.

FLISZAR, K.A.; FOSTER, N. Examination of metformin hydrochloride in a continuous dissolution/HDM system. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 351, p. 127–132, 2008.

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

- FROST, N.W.; JING, M.; BOWSER, M.T. Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 12, p. 4682–4698, 2010.
- GALLEGO, M.R. Terapêutica oral da Diabetes tipo 2. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, v. 21, p. 575-584, 2005.
- GALLWITZ, B. Sitagliptin with metformin: Profile of a combination for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Today*, v. 43, n. 10, p. 681, 2007.
- GALLWITZ, B. The evolving place of incretin-based therapies in type 2 diabetes. *Pediatric Nephrology*, v. 25, p. 1207-1217, 2010.
- GAO, J.; ZHANG, Q.; SU, K.; WANKG, J. Competitive biosorption of Yellow 2G and Reactive Brilliant Red K-2G onto inactive aerobic granules: Simultaneous Determination of two dyes by first-order derivative spectrophotometry and isotherm studies, v. 101, p. 5793-5801, 2010.
- GILBERT, M.P.; PRATLEV, R.E. Efficacy and safety of incretin-based therapies in patients with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Internal Medicine*, v. 20, p. S309- S318, 2009.
- GÖRÖG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. *Trends in analytical chemistry*, v. 26, n. 1, p. 12-17, 2007.
- HALIMI, S.; SCHWEIZER, A.; MINIC, B.; FOLEY, J.; DEJAGER, S. Combination treatment in the management of type 2 diabetes: focus on vildagliptin and metformin as a single tablet. *Journal of Vascular Health and Risk Management*. v. 4, n. 3, p. 481-492, 2008.
- HAMDAN, I.I.; BANI JABER, A.K.; ABUSHOFFA, A.M. Development and validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of metformin hydrochloride in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 1254–1257, 2010.
- HEGAZI, M. A.; YEHA, A. M. MOSTAFA, A.A. Stability-indicating methods for the determination of mosapride citrate in the presence of its degradation products according ICH guidelines. *Drug Testing and Analysis*, v. 4, n. 2. p. 104-115, 2012.
- HEMKENS, L.G.; GROUVEN, U.; BENDER, R.; GUNSTER, C.; GUTSCHMIDT, S.; SELKE, G.W.; SAWICKI, P.T. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulina analogues: a cohort study. *Diabetologia*, v. 52, p. 1732-1744, 2009.
- HENNESS, S.; KEAM, S. J. Vildagliptin. *Drugs*, v. 66, n. 15, p. 1989-2001, 2006.

HOOGWERF, B.J.; DOSHI, K.B.; DIAB, D. Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vascular Health and Risk Management*, v. 4, n. 2, p. 355-362, 2008.

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

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>. Acesso em Janeiro, 2013.

KARPINSKA, J. Derivative spectrophotometry—recent applications and directions of developments . *Talanta*, v. 64, p. 801-822, 2004.

JENA, A.K. HPLC: Highly Accessible Instrument in Pharmaceutical Industry for Effective Method Development. *Pharmaceutica Analytica Acta*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2011.

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

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNA, H.; HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KAVITHA,K.Y.;GEETHA, G.; HARIPRASAD, R.;KAVIARASU, M.; VENKATNARAYANAN, R. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of linagliptin and metformin in pure and pharmaceutical dosage form. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. v. 5, n.1, p. 230-235, 2013.

KAWABATA, Y.; WADA, K.; NAKATANI, M.; YAMADA, S.; ONOU, S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 420, p. 1-10, 2011.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2007.

KEATING, G.M. Vildagliptin A Review of its Use in Type 2 Diabetes Mellitus. *Drugs*, v. 70, n. 16, p. 2089-2112, 2010.

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

KUCHARSKA, M.; GRABKA, J. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta*, v. 80, p. 1045-1051, 2010.

KUPKAR, S.; YADHAV, S. Simultaneous estimation of sitagliptin and metformin hydrochloride in bulk and dosage forms by UV-spectrophotometry. *International Journal of Pharmacy Research*, v. 5, n. 1, p. 580-582, 2012.

LIBBY G.; DONNELLY, L.A.; DONNAN, P.T.; ALESSI, D.R.; MORRIS, A.D.; EVANS, J.M. New users of metformin are at low risk of incident cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 32, p. 1620-1625, 2009.

LINDENBERG, 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.

LOPES, V.P.; JÚNIOR, M.C.S.; JÚNIOR, A.F.S.; SANTANA, A.I.C. Farmacologia do diabetes mellitus tipo 2: antidiabéticos orais, insulina e inovações terapêuticas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. IX, n. 4, p. 69 - 90, 2012.

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.

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

MATHIEU, C.; DEGRANDE, E. Vildagliptin: a new oral treatment for type 2 diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management*, v. 4, n. 6, p. 1349–1360, 2008.

MATTHEWS, D. R.; DEJAGER, S.; AHREN, B.; FONSECA, V.; FERRANNINI, E.; COUTURIER, A.; FOLEY, J.E.; ZINMAN, B. Vildagliptin add-on to metformin produces similar efficacy and reduced hypoglycaemic risk compared with glimepiride, with no weight gain: results from a 2-year study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 12, n. 9, p.780-789, 2010.

MEHTA, S.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Strategy for identification and characterization of small quantities of drug degradation products using LC and LC-MS: application to valsartan, a model drug. *Drug Testing and Analysis*, v. 2, p. 82-90, 2010.

MOHAMMAD, M.A.; ELKADY, E.F.; FOUAD, M.A. Development and validation of a reversed-phase column liquid chromatographic method for simultaneous determination of two novel gliptins in their binary mixtures with metformin. *European Journal of Chemistry*, v. 3, n. 2, p. 152-155, 2012.

MONAMI, M.; MARCHIONNI, N.; MANNUCCI, E. Glucagonlike peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Endocrinology*, v. 160, p. 909-917, 2009.

MONEEB, M.S. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of saxagliptin and vildagliptin in bulk and pharmaceutical preparations. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, v.51, n. 2, p. 139-150, 2013.

NATHAN, D. M.; BUSE, J. B.; DAVIDSON, M. B.; FERRANNINI, E.; HOLMAN, R. R.; SHERWIN, R.; ZINMAN, B. Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy
A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, v. 32, p. 193-203, 2009.

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

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

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

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

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

PHARMACOPEIAL FORUM. *Pharmacopeial Previews*, v. 30, n. 1, p. 351-363, 2004.

QURESHI, S.A. Developing Discriminatory Drug Dissolution Tests and Profiles: Some Thoughts for Consideration on the Concept and Its Interpretation. *Dissolution Technologies*, v. 13, n. 1, p. 18-23, 2006.

RAMALHO, A.C.R.; LIMA, M.L. *Insulina e antidiabéticos orais. Farmacologia*. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 805-823, 2006.

RAMAUTAR, R.; MAYBORODA, O.A.; SOMSEN, G.W.; JONG, G.J. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008–2010. *Electrophoresis*, v. 32, p. 52-65, 2011.

RIAD, S. M.; REZK, M. R.; MAHMOUD, G. Y.; ALEEM, A. E. B. A. Spectrophotometric determination of sitagliptin and metformin in their pharmaceutical formulation. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, v. 5, n. 1, 2012.

ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004-2008 A review. *Analytica Chimica Acta*, v.635, p. 22-44, 2009.

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

SALIM, M.; EL-ENANY, N.; BELAL, F.; WALASH, M.; PATONAY, G. Simultaneous Determination of Sitagliptin and Metformin in Pharmaceutical Preparations by Capillary Zone Electrophoresis and its Application to Human Plasma Analysis. *Analytical Chemistry Insights*, v. 7, p. 31–46, 2012.

SCHWARTZ S.; FONSECA, V.; BERNER, B.; CRAMER, M.; CHIANG, Y.K.; LEWIN, A. Efficacy, tolerability, and safety of a novel once-daily extended-release metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 29, n. 4, p. 759-764, 2006.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. *Chromatographia*, v. 72, n. 1/2, p. 1-6, 2010.

SERRA, H.; BRONZE, M.R.; SIMPLÍCIO, A.L. Simultaneous determination of clopidogrel and its carboxylic acid metabolite by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v. 878, p. 1480-1486, 2010.

SETTER, S. M.; ILTZ, J. L.; THAMS, J.; CAMPBELL, R. K. Metformin Hydrochloride in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Review with a Focus on Dual Therapy. *Clinical Therapeutics*, v. 25, n. 12, p. 2991-3026, 2003.

SHABIR, G.A.; LOUGH, W.J.; ARAIN, S.A.; BRADSHAW, T.K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 30, p. 311-333, 2007.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, v. 87, p. 4-14, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000. Diagnóstico e classificação do Diabetes mellitus e tratamento do Diabetes mellitus tipo 2. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br>. Acesso em Março, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009. Disponível em: <http://2013.diabetes.org.br/colunistas/51-dr-reginaldo-albuquerque/375-mortes-por-diabetes-estao-aumentando-no-brasil>. Acesso em Março, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011. Disponível em: <http://www.diabetesebook.org.br>. Acesso em Março, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br>. Acesso em Março, 2014.

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

STORPIRTIS, S., MARCOLONGO, R., GASPAROTTO, F. S., VILANOVA, C.M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. *Infarma*, 2004, v. 16, n. 9-12, p. 51-56.

SUNTORNUSUK, L. Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis: A Survey on Recent Applications. *Journal of Chromatographic Science*, v. 45, p. 559-577, 2007.

SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, p. 29-52, 2010.

TODD, J.F.; BLOOM, S.R. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabetic Medicine*, v. 24, n. 3, p. 223-232, 2007.

USP 36. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 35th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2013.

VYAS, V. K.; GHATE, M. UKAWALA, R. D. Recent advances in characterization of impurities – Use of hyphenated LC-MS technique. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 6, n. 4, p. 299-306, 2010.

VON BROCKE, A.; NICHOLSON, G.; BAYER, E. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis*, v. 22, p. 1251–1266, 2001.

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

WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis: a Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceuticals Chemists*, 2th ed., Elsevier Churchill Livingstone: Edinburgh, 2005.

WEINERT, L.S.; CAMARGO, E.G.; SILVEIRO, S.P. Tratamento medicamentoso da hiperglicemia no diabetes melito tipo 2. *Revista HCPA*, v. 30, n. 4, p. 372-381, 2010.

WHO - World Health Organization. Diabetes [WHO Web site]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Acesso em: Março, 2014.

WU, C.; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical Research*, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.

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

ZANG, Y.; HUO, M.; ZHOU, J.; ZOU, A.; LI, W.; YAO, C.; XIE, S. DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 3, p. 263-271, 2010.