

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

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE QUÍMICO E BIOFARMACÊUTICO DE
LINAGLIPTINA

RITA ELENA DE ABREU ENGEL

Porto Alegre

2014

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

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE QUÍMICO E BIOFARMACÊUTICO DE
LINAGLIPTINA

Dissertação apresentada por **RITA ELENA
DE ABREU ENGEL** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Coorientadora: Prof^a Dr. Nadia Maria Volpato

Porto Alegre

2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.^a Dr. Cássia Virgínia Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Universidade Federal do Pampa

CIP - Catalogação na Publicação

Engel, Rita Elena de Abreu
Desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade para o controle de qualidade químico e biofarmacêutico de linagliptina / Rita Elena de Abreu Engel. -- 2014.
142 f.

Orientador: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

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

1. Linagliptina. 2. Controle de Qualidade. 3. Dissolução. 4. Validação de métodos analíticos. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman, orient. II. Título.

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

"Felicidade é uma combinação de sorte com escolhas bem feitas"

Martha Medeiros

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade da conclusão de mais uma etapa;

À minha família, em especial meus pais Luiz e Claire, pelo apoio incondicional, amor e força durante todas as etapas que antecederam esta conquista;

À minha vó Hertha que sempre foi um exemplo de determinação e força, que não desiste nunca de nada;

À professora Elfrides Schapoval pela orientação, apoio, otimismo e estímulo em momentos difíceis e pela autonomia que foi confiada para o desenvolvimento deste trabalho;

À professora Nadia Volpato pelas discussões, auxílio na retirada de dúvidas e exemplo profissional;

Ao Giuliano Nunes, que me apoiou e entendeu os momentos de ausência para a realização deste sonho;

Aos professores do LEPCQ, Cássia V. Garcia, Martin Steppe e Tércio Oppe pelo auxílio, receptividade e exemplo de profissionalismo;

Às amigas Isabel e Fernanda pelos momentos de descontração, carinho e apoio nos momentos difíceis;

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Márcia, Magda, Mariana, Nathalie, Letícia C., Alini, Diogo, Vitor, Camila, Alianise, Rúbia, Aline, Letícia S., Jaison, Fábio, Rodolfo e Rafaela pela amizade, companheirismo, convivência e troca de experiências e conhecimentos. Às bolsistas Natália e Sarah pelo auxílio nos experimentos e amizade. Em especial para Amanda pela motivação, acolhimento e contribuições na realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela estrutura disponível para a execução deste trabalho e aos professores do PPGCF pelas disciplinas disponibilizadas;

À central analítica da Faculdade de Farmácia pela colaboração nos estudos com espectrometria na região do infravermelho e de massas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro;

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. OBJETIVO GERAL.....	9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. DIABETES.....	13
3.2. CLASSE DE FÁRMACOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DO DM TIPO 2	14
3.3. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DE LGT	15
3.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA LINAGLIPTINA.....	17
3.5. ESTUDOS PUBLICADOS NA ÁREA DE CONTROLE DE QUALIDADE SOBRE AS GLIPTINAS	18
4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LINAGLIPTINA..	21
4.1. INTRODUÇÃO.....	235
4.2. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LGT.....	27
4.2.1. Linagliptina SQR.....	27
4.2.2. Linagliptina Formulação Amostra (FA)	27
4.2.3. Determinação da faixa e do ponto de fusão	27
4.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial	28
4.2.5. Caracterização de SQR por Espectrofotometria na região do IV	29
4.2.6. Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	30
4.2.7. Identificação da SQR e FA por espectrofotometria no UV.....	34
4.2.8. Identificação da linagliptina SQR e FA por CLAE	35

4.2.9. Caracterização e identificação da SQR e FA por UPLC com detector de massas.....	36
4.3. CONCLUSÕES.....	38
5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E ESTUDO DE ESTABILIDADE: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIOS E ESTUDO DE DANO À MEMBRANA CELULAR PELOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	39
5.1. INTRODUÇÃO.....	41
5.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43
5.1.2. Estudo de Estabilidade.....	44
5.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
5.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	45
5.2.1.1. Equipamento e reagentes.....	45
5.2.1.2. Otimização do método cromatográfico.....	45
5.2.1.3. Condições cromatográficas.....	46
5.2.1.4. Validação.....	47
5.2.1.5. Preparo da curva padrão.....	47
5.2.1.6. Preparo do placebo.....	48
5.2.1.7. Preparo da solução amostra.....	48
5.2.2. Cinética de degradação.....	49
5.2.3. Identificação dos produtos de degradação majoritários nas condições alcalina e fotolítica.....	49
5.2.4. Estudo de citotoxicidade por dano à membrana celular.....	49
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.3.1. Otimização do método por CLAE.....	50
5.3.2. Validação de método analítico.....	51
5.3.2.1. Especificidade.....	52
5.3.2.2. Linearidade.....	54
5.3.2.2.1. Limite de detecção e quantificação.....	56
5.3.2.3. Precisão.....	57
5.3.2.4. Exatidão.....	57
5.3.2.5. Robustez.....	58

5.3.2.6.	Estabilidade da amostra	60
5.3.3.	Cinética de degradação	61
5.3.4.	Identificação dos produtos de degradação majoritários.....	62
5.3.5.	Estudo de citotoxicidade por dano à membrana celular	66
5.4.	CONCLUSÕES.....	67
6.	CAPÍTULO III – TESTE DE DISSOLUÇÃO PARA OS COMPRIMIDOS DE LINAGLIPTINA.....	69
6.1.	INTRODUÇÃO.....	713
6.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
6.2.1.	Otimização do método de dissolução	74
6.2.2.	Validação da análise quantitativa de LGT por espectrofotometria no UV	76
6.2.2.1.	Preparo do tampão citrato (50 mM, pH 3,5)	77
6.2.2.2.	Preparo do placebo	77
6.2.2.3.	Preparo da solução amostra para avaliação da exatidão.....	77
6.2.2.4.	Especificidade	78
6.2.2.5.	Linearidade.....	78
6.2.2.6.	Precisão	78
6.2.2.7.	Exatidão	79
6.2.2.8.	Robustez	79
6.2.3.	Validação do método de dissolução	80
6.2.3.1.	Doseamento da amostra empregada na avaliação da precisão e exatidão	80
6.2.3.2.	Linearidade.....	81
6.2.3.3.	Precisão/ Exatidão.....	81
6.2.3.4.	Robustez	81
6.2.4.	Bioisenção	82
6.2.4.1.	Preparo dos meios de dissolução.....	83
6.2.4.1.1.	Solução HCl 0,1 M.....	83
6.2.4.1.2.	Tampão Acetato 50 mM pH 4,5.....	83
6.2.4.1.3.	Tampão fosfato pH 6,8	84
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
6.3.1.	Otimização do método de dissolução	84
6.3.2.	Validação do método de quantificação por espectrofotometria de UV	86

6.3.2.1.	Especificidade	86
6.3.2.2.	Linearidade.....	87
6.3.2.3.	Precisão	89
6.3.2.4.	Exatidão	89
6.3.2.5.	Robustez	90
6.3.3.	Validação de método de dissolução	91
6.3.3.1.	Doseamento de LGT	91
6.3.3.2.	Linearidade.....	92
6.3.3.3.	Exatidão/ Precisão.....	94
6.3.3.4.	Robustez	95
6.3.4.	Bioisenção	96
6.4.	CONCLUSÕES.....	98
7.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL.....	99
	REFERÊNCIAS.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução do DM no mundo entre os anos de 2000 a 2030.....	4
Figura 2. Mecanismo de ação dos fármacos glicose-dependentes inibidores de DPP-IV	16
Figura 3. Estrutura química da linagliptina	17
Figura 4. Estrutura química de algumas gliptinas (linagliptina, vildagliptina, fosfato de sitagliptina e saxagliptina)	19
Figura 5. Curva de aquecimento de LGT SQR obtida por DSC.	28
Figura 6. Espectro na região do IV de linagliptina SQR	29
Figura 7. Espectro de RMN ¹ H de LGT SQR em solvente DMSO _{d6}	31
Figura 8. Espectro de RMN ¹³ C de LGT SQR em solvente DMSO _{d6}	32
Figura 9. Comparação da FA com SQR em diferentes solventes. (a) etanol, (b) água, (c) metanol e (d) ACN na concentração de 10 µg.mL ⁻¹ de LGT.	34
Figura 10. Cromatogramas sobrepostos de Amostra e SQR de linagliptina obtidos por CLAE.....	35
Figura 11. Cromatograma comparativo da SQR de LGT (a) e amostra de comprimidos de LGT (b) na concentração de 20 µg.mL ⁻¹ com seus respectivos espectros de UV.....	36
Figura 12. Espectro de massas de LGT SQR (a) e Amostra (b).	37
Figura 13. Diagrama das condições avaliadas na otimização do método cromatográfico.....	46
Figura 14. Cromatograma da amostra de linagliptina versus o placebo a 293 nm....	53
Figura 15. Cromatogramas das condições de degradação forçada. (a) Solução de HCl 1,0 M de 0 a 48 horas; (b) Solução de NaOH 1,0 M de 0 a 48 horas; (c) Solução de H ₂ O ₂ 3% de 0 a 6 horas; (d) degradação térmica a 60°C de 0 a 6 horas; (e) degradação fotolítica em radiação UVA de 0 a 6 horas; (f) degradação fotolítica em radiação UVC de 0 a 6 horas.	53
Figura 16. Representação gráfica da curva de calibração da linagliptina por CLAE.	55
Figura 17. Gráfico dos resíduos padronizados gerados na curva padrão de LGT	55
Figura 18. Equações para determinação dos limites de determinação e quantificação, onde DP _a é o desvio padrão de três curvas padrão de linagliptina e IC é a média da inclinação destas três curvas.....	56

Figura 19. Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados em relação ao teor de LGT	59
Figura 20. Análise dos resíduos padronizados em relação ao teor de LGT nas diferentes condições avaliadas	60
Figura 21. Gráficos comparativos entre amostra e SQR para as diferentes ordens de cinética de degradação. Zero ordem: Coeficiente de determinação (R^2) para SQR e amostra, respectivamente: 0,9112 e 0,9667; Primeira ordem: R^2 para SQR e amostra, respectivamente: 0,9153 e 0,9775; Segunda ordem: R^2 para SQR e amostra, respectivamente: 0,9044 e 0,9709.	61
Figura 22. Cromatogramas de LGT: (a) detecção a 293 nm em 1,35 min; (b) detecção por ESI-MS: m/z 472,23 em 1,74 min e (c) padrão de fragmentação do fármaco a 25 V.	63
Figura 23. Análise por LC-MS em: (a) Fotodegradação por radiação UV-C em que LGT foi detectada ($m/z=472,23$), PD1 ($m/z = 205,07$); (b) Degradação alcalina sob aquecimento em que LGT foi detectada ($m/z = 472,23$) e PD2 ($m/z = 256,83$); (c) Espectro de massas do PD1 referente ao cromatograma (a); (d) Espectro de massas do PD2 referente ao cromatograma (b).....	64
Figura 24. Proposta de perfil de degradação de LGT nas condições fotolítica e alcalina	65
Figura 25. Espectros de UV de LGT (a), PD1 (b) e PD2 (c).....	65
Figura 26. Estudo de citotoxicidade por dano à membrana celular, antes e depois da condição de estresse. Triton X representa lesão celular (controle positivo). SND representa a solução não degradada. SD indicam exposição da solução à condição de estresse até 50% e 100 % de degradação. * Diferença significativa entre médias ($p<5\%$).....	66
Figura 27. Diagrama das condições de dissolução avaliadas para comprimidos revestidos de linagliptina	75
Figura 28. Comparativo entre os meios HCl 0,1 M, tampão citrato pH 3,5, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8 (n=2) em aparato pá.	84
Figura 29. Tampão citrato em aparato pá em diferentes pH: 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 (n=2) (*Volume de 900 mL).	85
Figura 30. Tampão citrato em aparato cesta em pH 3,5 e 5,5 e volumes diferentes (*500 mL e **900 mL) (n=2)	85

Figura 31. Sobreposição de espectros de UV de amostra de LGT (A) e placebo (B) na faixa de 400 a 200 nm	87
Figura 32. Curva padrão de LGT na faixa de 0,5 a 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	88
Figura 33. Plotagem dos resíduos padronizados da curva padrão de LGT	88
Figura 34. Grafico de Pareto para análise da robustez do método por UV. Legenda: (A) Solvente; (B) Comprimento de onda; (C) equipamento.....	91
Figura 35. Representação da curva padrão de LGT pelo método por UV	92
Figura 36. Representação da curva padrão de LGT pelo método por CLAE	93
Figura 37. Sobreposição de perfis de dissolução por UV e CLAE para avaliação da interferência de bolhas na quantificação dos comprimidos do reagente A.....	95
Figura 38. Sobreposição de perfis de dissolução por UV e CLAE para avaliação da interferência de bolhas na quantificação dos comprimidos do reagente B.....	96
Figura 39. Sobreposição dos perfis de dissolução dos diferentes meios avaliados ..	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais parâmetros farmacocinéticos de LGT após uma dose oral de 5 mg.	15
Tabela 2. Interpretação das principais bandas do espectro de IV da LGT SQR.	30
Tabela 3. Atribuições do espectro de RMN ¹ H obtido pela análise de LGT SQR em DMSO _{d6}	33
Tabela 4. Atribuições do espectro de RMN ¹³ C obtido pela análise de LGT SQR em DMSO _{d6}	33
Tabela 5. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	41
Tabela 6. Métodos de análise para determinação de linagliptina comprimidos.....	42
Tabela 7. Condições cromatográficas utilizadas na validação de método por CLAE para determinação de linagliptina em comprimidos.	46
Tabela 8. Adjuvantes farmacêuticos presentes nos comprimidos revestidos de Trayenta [®] 5 mg com suas respectivas funções e porcentagens propostas para elaboração do placebo.	48
Tabela 9. Parâmetros de adequabilidade do sistema de acordo com o FDA (1994).52	
Tabela 10. Valores experimentais obtidos para curva padrão de linagliptina por CLAE.....	54
Tabela 11. Análise da variância dos resultados de linearidade de linagliptina.....	56
Tabela 12. Precisão intra e interdia para os comprimidos de LGT.....	57
Tabela 13. Resultados obtidos para o percentual de recuperação da amostra.....	57
Tabela 14. Fatores e níveis utilizados no teste de robustez do método por CLAE ...	58
Tabela 15. Fatores selecionados e resposta obtida no desenho experimental de PB.	59
Tabela 16. Valores calculados de k, t _{1/2} e t ₉₀ para cinética de zero, primeira e segunda ordem.	62
Tabela 17. Esquema de diluição para obter a curva padrão de linagliptina.....	78
Tabela 18. Níveis avaliados na exatidão para o método por UV.....	79
Tabela 19. Fatores e níveis utilizados no teste de robustez do método por UV.....	80
Tabela 20. Níveis utilizados para determinação da concentração de LGT no ensaio de exatidão.....	81

Tabela 21. Variáveis utilizadas no desenho experimental fatorial completo 2 ²	82
Tabela 22. Valores de absorvâncias obtidas para a curva padrão de LGT	87
Tabela 23. Análise da variância dos resultados de linearidade de LGT	89
Tabela 24. Valores de precisão para as amostras de LGT	89
Tabela 25. Resultados de recuperação obtidos para amostra de LGT.	90
Tabela 26. Fatores avaliados e a resposta em relação ao teor de LGT.	90
Tabela 27. Doseamento de LGT em dois dias consecutivos (n=12)	91
Tabela 28. Absorvâncias obtidas para curva padrão de LGT pelo método por UV e áreas por CLAE.	92
Tabela 29. Análise da variância da curva padrão de LGT pelo método por UV	93
Tabela 30. Análise da variância para curva padrão de LGT pelo método por CLAE	94
Tabela 31. Resultados de precisão e exatidão para dissolução nos dois dias avaliados.	95
Tabela 32. Valores obtidos nos diferentes meios para obtenção dos perfis de dissolução	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila;
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ANOVA – Análise da variância;
CIVIV – Correlação *in vitro* – *in vivo*;
CLAE – Cromatografia à liquido de alta eficiência;
DM – *Diabetes mellitus*;
DMSO_{d6} – Dimetilsulfóxido Deuterado;
DPP-IV – dipeptilpeptidase IV;
DPR – Desvio padrão relativo;
EFPIA - *European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*;
FA – Formulação amostra;
FB – Farmacopeia Brasileira;
FDA – *Food and Drug Administration*;
FFSOLI – Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata;
ICH – *International Conference on Harmonization*;
IDF - *International Diabetes Federation*;
IV – Espectrometria na região do Infravermelho;
K – Constante da velocidade de degradação;
LDH – Lactato desidrogenase;
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
LGT – Linagliptina;
MS – *Mass spectrometry* – Espectrometria de massas;
m/z – Relação massa/ carga;
OMS – Organização Mundial da Saúde;
PD – Produto de degradação;
PB – Plackett-Burman;
pvdf – fluoreto de polivinilideno;
R² – Coeficiente de determinação;
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada;
RMN – Ressonância Magnética Nuclear;
RPM – Rotações por minuto;
t_{1/2} - Tempo de meia vida;

RESUMO

Linagliptina (LGT) é um fármaco membro da classe de gliptinas que inibe a enzima dipeptidil - peptidase - 4 . Elas são usadas para reduzir os níveis de glicose no sangue em pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2. Devido a seu recente desenvolvimento e lançamento no mercado, a LGT não tem monografia em compêndio oficial, nem em registros nacionais ou internacionais disponíveis para determinações qualitativas e quantitativas indicativas de estabilidade do fármaco. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método cromatográfico para caracterizar LGT em forma de comprimido contendo 5 mg do fármaco, avaliar a cinética de degradação de LGT frente à condição alcalina (padrão e amostra), determinar a possível citotoxicidade dos produtos de degradação, tanto do fármaco quanto do padrão, em células mononucleares e sugerir os possíveis principais produtos de degradação, além de desenvolver método de dissolução para os comprimidos. Um método simples por cromatografia líquida de fase reversa indicativo de estabilidade foi otimizado e validado de acordo com o *International Conference on Harmonization* sob os critérios de aceitação como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e adequabilidade do sistema. A coluna analítica C8 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) foi utilizada a 30 °C com uma mistura de água (trietilamina 1,0 %, ajustado para pH 4,5 com ácido ortofosfórico) e de acetonitrila (80:20, v/v), com vazão de 1,2 mL.min⁻¹ e a detecção a 293 nm. Os excipientes não interferiram na determinação da LGT. Além disso, em estudos de degradação forçada, não foi observada interferência no pico do fármaco. A cinética de degradação em meio básico sob aquecimento a 60 °C foi determinada e tanto padrão e amostra seguem cinética de primeira ordem com constante (k) igual a 0,25 h⁻¹ e 0,21 h⁻¹, t_{1/2} igual a 2,77 h e 3,31 h e coeficiente de determinação igual a 0,9153 e 0,9775 para o padrão e amostra, respectivamente. Foram avaliados os danos da membrana celular provocados pela LGT a 100 mg mL⁻¹ e pelos produtos de degradação formados. Nas concentrações avaliadas e na degradação forçada até 50% e 100% dos comprimidos, não foi verificado nenhum dano celular tanto à luz UV-C quanto na condição alcalina. As estruturas moleculares foram sugeridas a partir de análises de espectro de massa para a identificação dos produtos de degradação formados. A LGT foi obtida após 6,3 min de análise e a resposta foi linear na faixa de 1-50 µg mL⁻¹ (r = 0,9998), observou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativa por meio de análise de variância. O método foi preciso (DPR intradia e interdia < 1,10 %), exatidão (média de recuperação = 98,6%), e robusto. Limite de detecção e limite de quantificação foram de 0,14 e 0,45 mg.mL⁻¹, respectivamente. Para análise biofarmacêutica foi desenvolvido método de dissolução utilizando meio citrato pH 3,5 com aparato cesta, velocidade de agitação de 75 rpm à temperatura de 37 ± 0,5 °C. De acordo com os resultados obtidos, o fármaco pode ser um candidato à bioisenção. As condições propostas foram aplicadas com sucesso para a análise quantitativa da LGT em comprimido, o que ajudará a melhorar o controle de qualidade de medicamentos e contribuir para estudos de estabilidade desta gliptina.

PALAVRAS-CHAVE: Linagliptina; cromatografia líquida de alta eficiência; estudo de estabilidade; dano à membrana celular; espectrometria de massas; ensaio de dissolução; bioisenção.

ABSTRACT

Linagliptin (LGT) is drug a member of the class of gliptins that inhibits the enzyme dipeptidyl-peptidase-4. They are used to reduce glucose blood levels in patients with type 2 Diabetes mellitus. Due to its recent development and market launching, LGT has no official compendium monograph, national or international, or available registries for qualitative and quantitative determinations of this drug. The objective of this work was to develop a LC method to characterize LGT in tablet dosage form containing 5 mg, evaluating the kinetics of degradation of LGT (standard and sample), determining the possible cell membrane damage of drug degradation products in mononuclear cells and suggest the possible major degradation products. A simple and stability-indicating reversed-phase liquid chromatography method was optimized and validated according to International Conference on Harmonization acceptance criteria for specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and system suitability. A C8 analytical column (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m) was operated at 30 °C with a mixture of triethylamine 1.0% and acetonitrile (80:20, v/v), adjusted to pH 4.5 with orthophosphoric acid, at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹ and detection at 293 nm. The excipients did not interfere in the determination of LGT. Furthermore, in forced degradation studies no interference in the drug peak was observed. The kinetics of degradation in basic medium under heating at 60 °C was determined and standard both standard and sample follows first order kinetic with constant (k) equal to 0,25 h⁻¹ and 0,21 h⁻¹, t_{1/2} equal to 2,77 h and 3,31 h and coefficient of determination equal to 0,9153 and 0,9775 for standard and sample, respectively. The cell membrane damage of LGT at 100 μ g mL⁻¹ and the formed products by its degradation were evaluated. At the appraised concentration and at forced degradation until 50% and 100% of the tablets, both UV-C light and alkaline conditions, no cell damage was verified. Structures were suggested for identifying the degradation products formed from mass spectral analyzes. The chromatography was obtained within 6.3 min and the response was linear in the range of 1–50 μ g mL⁻¹ (r= 0.9998) showed significant linear regression and non-significant linearity deviation by analysis of variance. The method was precise (intra-day relative standard deviation (RSD) and inter-day RSD values < 1.10%), accurate (mean recovery = 98.6%), and robust. Limit of detection and limit of quantitation were 0.14 and 0.45 μ g mL⁻¹, respectively. For biopharmaceutical analysis, a dissolution method was developed using citrate medium pH 3.5, basket apparatus, stirring rate of 75 rpm at temperature of 37 \pm 0.5 °C. According to the results, the drug may be a biowaiver candidate. The proposed conditions were successfully applied for the quantitative analysis of LGT in tablet dosage form, which will help improving the drug quality control and contribute to stability studies of this gliptin.

KEYWORDS: Linagliptin; high performance liquid chromatography; stability studies; membrane cell damage; mass spectrometry; dissolution test; biowaiver

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico na área farmacêutica vem se difundindo e obtendo maior visibilidade na agenda governamental e na sociedade. A maior abrangência dos medicamentos garante a existência de produtos para quase todas as enfermidades. Além disso, os medicamentos são cada vez mais seguros e eficazes, contribuindo para aumentar a expectativa e a qualidade de vida da população (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Durante o processo de desenvolvimento do fármaco, a validação de método analítico é realizada para garantir que o mesmo seja exato, específico e reprodutível dentro de uma determinada variação na qual a substância em exame será analisada. Conforme a definição existente na Farmacopeia Americana, a validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que o método efetivamente realiza o que se propõe a executar” (USP 36, 2013).

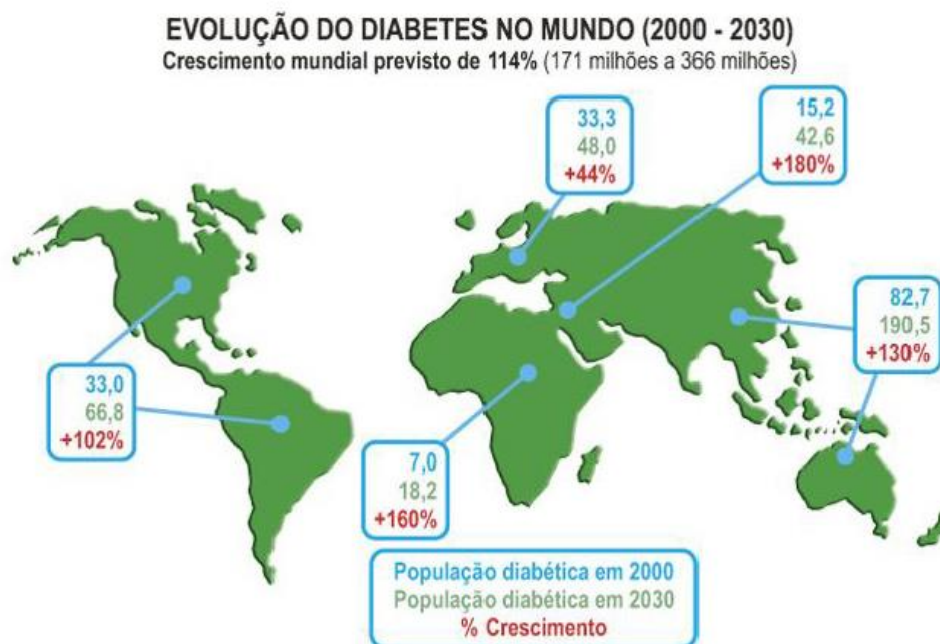
Há uma tendência de mercado para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças metabólicas, como o diabetes e suas complicações associadas. As principais áreas de investigação a desenvolver, relacionadas com a prevenção e o tratamento do diabetes e as suas complicações, são as doenças cardiovasculares, o metabolismo dos lipídeos, a obesidade e o metabolismo da glicose (EFPIA, 2007).

Diabetes mellitus (DM) é uma das doenças mais comuns não transmissíveis em todo o mundo. Dados epidemiológicos (Figura 1) mostram que 366 milhões de pessoas eram portadoras de diabetes em 2011, este número pode atingir 552 milhões em 2030. Há um agravante nesses dados, estima-se que 183 milhões de pessoas apresentam diabetes não diagnosticada (IDF, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (2011) define o DM como uma doença crônica, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente, ou quando o corpo não pode utilizar de forma eficaz a insulina que produz, isto leva a um aumento da concentração de glicose no sangue, sendo, sem dúvida, um dos problemas de saúde mais desafiador do século 21 (IDF, 2011).

Neste sentido surgiu, em 2006, a sitagliptina, o primeiro medicamento de uma nova classe de fármacos para o DM tipo 2, as gliptinas. Segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), esta é a classe de medicamento de primeira escolha, no caso de intolerância à metformina.

Figura 1. Evolução do DM no mundo entre os anos de 2000 a 2030.



Fonte: World Health Organization. Diabetes programm. Facts and figures. Prevalence data. Disponível em <http://www.int/diabetes/facts/world_figures/en/>

As gliptinas atuam inibindo a dipeptilpeptidase IV (DPP-IV). Ao inibir esta enzima, o medicamento impede a destruição das incretinas (GLP-1 e GIP), hormônios que estimulam o pâncreas a produzir insulina quando o nível de glicose no sangue está alto. Além disso, as gliptinas reduzem os níveis de glucagon em pacientes que não conseguem atingir os níveis ideais de glicose com dieta e exercício (SCHEEN, 2012). Atualmente fazem parte desta classe os seguintes fármacos: fosfato de sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, alogliptina e linagliptina (LGT) (NEUMILLER; SETTER, 2012).

A LGT foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), em maio de 2011. No Brasil é comercializada desde julho de 2011, com o nome de Trayenta[®], em comprimidos revestidos de 5 mg (BRASIL, 2011a). O desenvolvimento e comercialização do produto são de responsabilidade da indústria Boehringer Ingelheim[®].

Devido a seu recente desenvolvimento e lançamento no mercado, a LGT não possui monografia em compêndios oficiais, nacional ou internacional, apenas registros de métodos de quantificação sem avaliação da estabilidade ou identificação de possíveis produtos de degradação. Verificou-se, também, não haver estudos para avaliar a dissolução do produto.

Justifica-se, portanto, desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade que possibilite avaliar a qualidade da LGT na forma farmacêutica sólida comercializada. Este desenvolvimento pode contribuir na hipótese de surgimento futuro de medicamentos similares ou genéricos deste fármaco, pois, até a presente data, a LGT está sob patente e é comercializada apenas por um laboratório no Brasil, bem como colaborar para a elaboração de monografia oficial do fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica para a caracterização e determinação quantitativa de linagliptina em comprimidos revestidos de 5 mg, bem como desenvolver e validar método de dissolução.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a Substância Química de Referência por espectrofotometria na região de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectrofotometria no ultravioleta (UV), espectrometria de massas, ponto e faixa de fusão, além da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- Caracterizar a LGT no produto acabado;
- Desenvolver método por cromatografia líquida específico e indicativo de estabilidade da molécula, aplicável ao insumo e à forma farmacêutica comprimido;
- Determinar a cinética de degradação do fármaco sob condições de estresse e identificar os produtos de degradação majoritários por cromatografia líquida de ultra performance com detector de massas (UPLC-UV-ESI-MS);
- Avaliar a possibilidade dos produtos de degradação majoritários da LGT infringirem dano à membrana celular;
- Desenvolver e validar método de dissolução para avaliação da forma farmacêutica comprimido revestido contendo LGT.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DIABETES

Segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2006), o DM não pode ser classificado como uma doença única, mas sim como um quadro metabólico que apresenta em comum a hiperglicemia. Essa glicemia é o resultado de defeito na ação da insulina, na secreção de insulina ou ambos.

A patologia é classificada em três tipos: Diabetes gestacional, DM tipo 1 e DM tipo 2, sendo a última, causada por utilização ineficaz de insulina pelo corpo (OMS, 2011). É a forma presente em 90 a 95% dos casos (BARCELÓ & RAJPATHAK, 2001; OPAS, 2003; SBD, 2009).

A presença de glicose elevada no sangue durante a gravidez é denominada de Diabetes Gestacional. Geralmente a glicose no sangue se normaliza após o parto. No entanto, as mulheres que apresentam ou apresentaram diabetes gestacional, possuem maior risco de desenvolverem diabetes tipo 2 tardiamente, o mesmo ocorrendo com os filhos (GOODMAN; GILMAN, 2003; SBD, 2013; OMS, 2013).

O DM tipo 1 é também conhecido como diabetes insulino dependente, diabetes infanto-juvenil e diabetes imunomediado. Neste tipo de diabetes a produção de insulina do pâncreas é insuficiente, pois suas células sofrem o que se chama de destruição autoimune. Os portadores de diabetes tipo 1 necessitam injeções diárias de insulina para manterem a glicose no sangue em valores normais. Há risco de vida se as doses de insulina não são dadas diariamente. O DM tipo 1 embora ocorra em qualquer idade é mais comum em crianças, adolescentes ou adultos jovens (GOODMAN; GILMAN, 2003; SBD, 2013; OMS, 2013).

O DM tipo 2 é também chamado de diabetes não insulino dependente ou diabetes do adulto e corresponde a 90% dos casos de diabetes. Ocorre, geralmente em pessoas obesas com mais de 40 anos de idade embora na atualidade se observa com crescente frequência em jovens, em virtude de maus hábitos alimentares, sedentarismo e estresse da vida urbana. Neste tipo de diabetes encontra-se a presença de insulina, porém sua ação é dificultada pela obesidade, o que é conhecido como resistência insulínica, uma das causas de hiperglicemia. Por ser pouco sintomática, o diabetes 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 (GOODMAN; GILMAN, 2003; SBD, 2013; OMS, 2013).

O paciente com DM tipo 2 pode não apresentar nenhum sintoma ou o mínimo de sintomas durante anos antes de ser diagnosticado. Pode, também, ter aumento da frequência urinária (poliúria), sede (polidipsia), fome (polifagia), e perda de peso inexplicada, além de sentir dormência nas extremidades, dor nos pés (disestesias), e visão turva. Outros sintomas são a presença de infecções recorrentes ou graves e os pacientes podem apresentar perda de consciência ou coma, mas isso é menos comum do que em DM tipo 1 (OMS, 2013).

3.2. CLASSE DE FÁRMACOS UTILIZADOS PARA O TRATAMENTO DO DM TIPO 2

Estão disponíveis no mercado diversos medicamentos para o controle da glicemia, como a metformina, do grupo das biguaninas, as sulfanilureias, metiglinidas, glitazonas, também chamadas de tiazolidinedionas, e os inibidores da alfa-glucosidade. Recentemente, novos fármacos foram introduzidos a esta lista: a exenatida, a pramlintida (BRANCHTEIN *et al.*, 2004) e as gliptinas (fosfato de sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, alogliptina e linagliptina) (NEUMILLER; SETTER, 2012).

Em maio de 2011, a Boehringer Ingelheim[®] lançou no mercado, com aprovação no FDA, mais um exemplar da classe das gliptinas, a LGT. No Brasil, sua aprovação foi publicada no Diário Oficial da União, em julho de 2011 (BRASIL, 2011a). O fármaco encontra-se disponível em comprimidos revestidos com 5 mg do ativo. Em 2012 foi aprovado pelo FDA o Jentaduetto[®], associação de LGT com metformina nas dosagens de 2,5 mg/ 500 mg, 2,5 mg/ 850 mg e 2,5 mg/ 1000 mg de LGT e metformina, respectivamente.

A grande vantagem desse fármaco é a sua metabolização hepática, a qual não necessita de ajuste de dose para pacientes com deficiência hepática ou renal (BLECH *et al.*, 2010 ; TRADJENTA, 2011). É excretado principalmente por vias de eliminação não renais (menos de 10% por eliminação renal, sendo o restante eliminado pela bile e fezes) (SARASHINA *et al.*, 2010). A LGT é o primeiro inibidor de DPP-IV com a rota de eliminação não renal (BARNETT, 2011).

3.3. FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DE LGT

A LGT é rapidamente absorvida em pacientes saudáveis e diabéticos. Seus principais parâmetros farmacocinéticos encontram-se descritos da Tabela 1. Nenhum impacto significativo na farmacocinética foi observado em relação à dose em diferentes pesos, idade, sexo ou raça, não necessitando de ajuste de dose (HORIE *et al.*, 2011; NEUMILLER; SETTER, 2012).

Tabela 1. Principais parâmetros farmacocinéticos de LGT após uma dose oral de 5 mg.

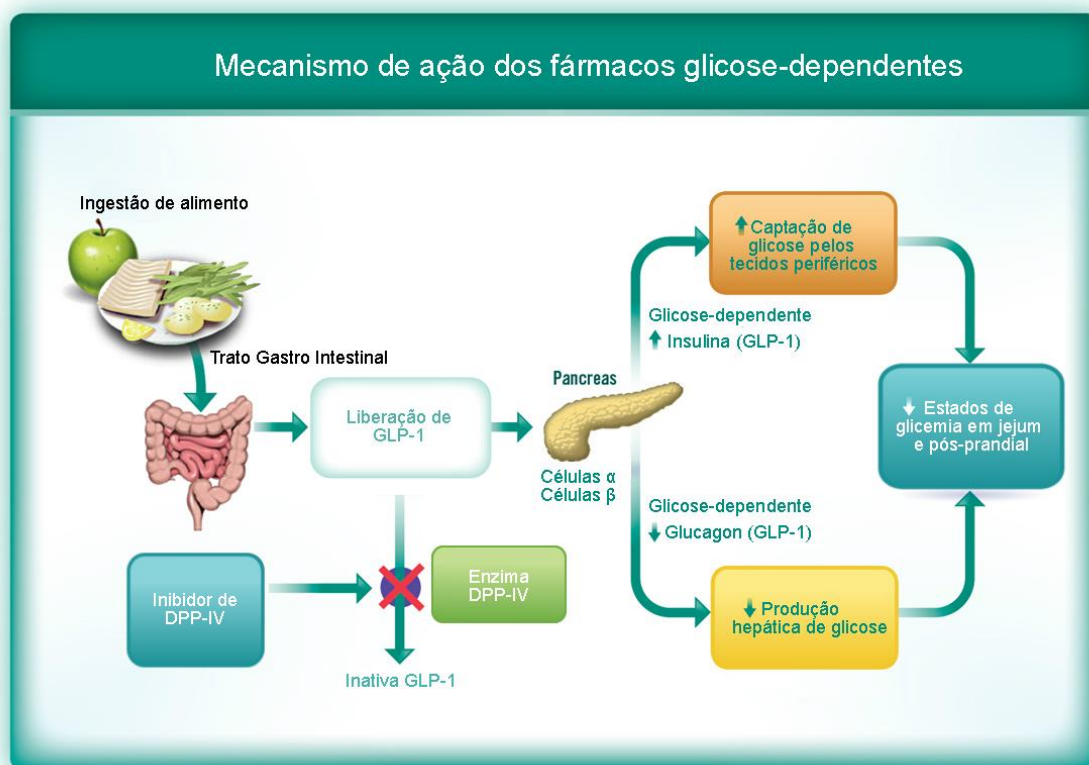
Parâmetro	Valor (Referência), Observações
T _{máx}	1,5 h (EMEA, 2012)
C _{máx}	8,9 nmol/L (FDA, 2011)
ASC	139 nmol.h/L (FDA, 2011). A ASC aumenta com a dose de maneira não proporcional (HORIE <i>et al.</i> , 2011; EMEA, 2012)
Meia-vida de eliminação	Maior que 100 h (TORNIO <i>et al.</i> , 2012; EMEA, 2012); 131 h (NEUMILLER; SETTER, 2012); 184 h (GERICH, 2010); 223-260 h (HORIE <i>et al.</i> , 2011). A longa meia-vida de eliminação está relacionada com a ligação saturável e forte de LGT à enzima DPP-IV e à extensiva ligação às proteínas plasmáticas, produzindo um perfil farmacocinético não linear e um efeito de inibição prolongado da DPP-IV.
F _{abs}	30 % (FDA, 2011; GRAEFE-MODY; RETLICH; FRIEDRICH, 2012, EMEA, 2012). A LGT pode ser administrada com alimentos.
Vd	1110 L (FDA, 2011; EMEA, 2012). A LGT se distribui extensivamente pelos tecidos. A ligação da LGT às proteínas plasmáticas é dependente da concentração. Em altas concentrações, onde a DPP-IV está saturada, 70-80 % da LGT liga-se a outras proteínas plasmáticas, e 20-30 % se mantém não ligada no plasma.
Eliminação	Fezes (80 %) e urina (5 %) (GERICH, 2010). Na metabolização cerca de 90 % da LGT é excretada inalterada. Uma pequena fração de LGT é metabolizada a um metabólito inativo (13,3 % no estado estacionário) (FDA, 2011; EMEA, 2012).
CL	70 mL.min ⁻¹ (FDA, 2011; EMEA, 2012).

Legenda: T_{máx}: tempo máximo para atingir o C_{máx}; C_{máx}: concentração plasmática máxima; ASC: Área sob a curva; F_{abs}: Biodisponibilidade absoluta; Vd: volume de distribuição aparente no estado de equilíbrio; CL: clearance renal no estado de equilíbrio.

O mecanismo de ação dos inibidores de DPP-IV é distinto de outros hipoglicemiantes orais. Embora não sejam mais potentes na redução da glicose sanguínea e a hemoglobina glicada, apresentam vantagens clínicas relevantes como risco negligenciável de hipoglicemia e peso corporal inalterado, podendo ser utilizados em monoterapia ou em associação (SCHEEN, 2012).

De acordo com a Boehringer Ingelheim[®], a LGT é um competidor reversível de DPP-IV, projetado especificamente para inibição prolongada da enzima DPP-IV, com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas adequadas para dosagem única diária (TRADJENTA, 2011). Os inibidores DPP-IV impedem a degradação enzimática de GLP-1 endógeno e GIP pela enzima DPP-IV (Figura 2). Esta inibição enzimática, por sua vez, potencializa os efeitos das incretinas, resultando em maior secreção de insulina dependente da glicose e supressão da secreção de glucagon pós-prandial a partir de células do pâncreas. Ao prolongar a atividade das incretinas, os inibidores da DPP-IV regulam os níveis de glicose de uma maneira dependente da própria glicose (NEUMILLER & SETTER, 2012).

Figura 2. Mecanismo de ação dos fármacos glicose-dependentes inibidores de DPP-IV



Fonte: Adaptados de Astra Zeneca, Mecanismo de ação de Onglyza[®]. Disponível em < <https://www.onglyza-hcp.com/hcp/about/moa.aspx>>.

Linagliptina liga-se à enzima DPP-IV de maneira reversível e, portanto, aumenta as concentrações hormonais de incretinas. O fármaco é glicose-dependente da secreção de insulina aumentando a secreção de glucagon, resultando, assim, em uma melhor regulação da homeostase da glicose. Linagliptina

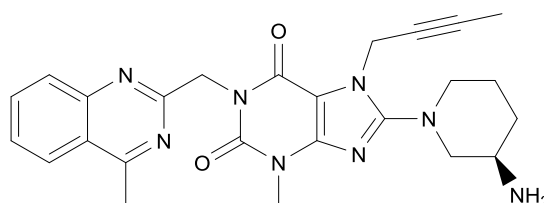
liga-se seletivamente à DPP-IV, e inibe seletivamente esta, mas não a atividade *in vitro* de DPP-8 e DPP-9 em exposições terapêuticas de concentrações aproximadas (FDA, 2011).

A farmacocinética não linear de LGT descreve como melhor modelo de distribuição o modelo de dois compartimentos, que integra a distribuição de fármacos alvo mediadores, resultando a partir da alta afinidade, ligação saturável ao inibidor de DPP-IV (GRAEFE-MODY; RETLICH; FRIEDRICH, 2012). Apesar da biodisponibilidade oral de LGT em estudos com animais ser em torno de 51 % em ratos e macacos (ECKHARDT *et al*, 2007; ECKHARDT *et al*, 2008), em humanos este valor reduz para 30 % (FDA, 2011; GRAEFE-MODY; RETLICH; FRIEDRICH, 2012, EMEA, 2012). Outros integrantes da classe possuem valores maiores de biodisponibilidade, como a vildagliptina com 85 % (HE *et al*, 2007) e fosfato de sitagliptina com valores acima de 87 % (HERMAN *et al*, 2007). Após ingestão oral, linagliptina é rapidamente absorvida e o T_{max} foi determinado no intervalo de tempo de 0,7 a 3 horas após a administração (GALLWITZ, 2012).

3.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA LINAGLIPTINA

O nome químico da LGT é 8-[(3R)-3-aminopiperidina-1-il]-7-(butil-2-in-1-il)-3-metil-1-[(4-metilquinazolina-2-il)metil]-3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona, sua fórmula molecular é $C_{25}H_{28}N_8O_2$, apresenta massa molar de 472,54 g/ mol (ACD/LABS, 2010), faixa de fusão de 202 a 209 °C (ECKHARDT, 2007) e número de registro CAS, 68270-12-0. Sua estrutura química está ilustrada na Figura 3. Apresenta duas constantes de dissociação (pKa) nos valores de 8,6 e 1,9 referentes à protonação da amina primária e do grupo quinazolina, respectivamente (FDA, 2011).

Figura 3. Estrutura química da linagliptina



De acordo com a classificação do FDA (2011) o fármaco é ligeiramente solúvel em água ($0,9 \text{ mg.mL}^{-1}$), solúvel em metanol (60 mg.mL^{-1}), moderadamente solúvel em etanol (cerca de 10 mg.mL^{-1}), ligeiramente solúvel em isopropanol e acetona (cerca de 1 mg.mL^{-1}).

3.5. ESTUDOS PUBLICADOS NA ÁREA DE CONTROLE DE QUALIDADE SOBRE AS GLIPTINAS

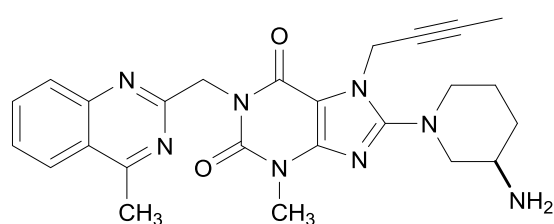
Os estudos clínicos fase III que embasaram as aprovações de Trayenta[®] pelas agências regulatórias envolveram cerca de seis mil pessoas com DM tipo 2. O programa incluiu estudos controlados com placebo avaliando a LGT em monoterapia (DEL PRATO *et al.*, 2011; KAWAMORI *et al.*, 2011) e em combinação com metformina, sulfonilureia, piolitazona e combinação tripla com metformina e sulfonilureia (FORST *et al.*, 2010; LEWIN *et al.*, 2010; OWENS *et al.*, 2011; TASKINEN *et al.*, 2011). Em dois estudos de monoterapia, a LGT apresentou uma diferença estatisticamente significativa na queda da hemoglobina glicada em relação ao placebo. O mesmo foi observado com a adição de LGT à terapia de pacientes cujo diabetes não estava adequadamente controlado com metformina ou com a associação de metformina com sulfonilureia. Os eventos de hipoglicemia foram raros e não houve alteração significativa no peso dos pacientes (NEUMILLER; SETTER, 2012).

Até o presente momento, além dos estudos clínicos envolvendo o fármaco LGT, há métodos analíticos quantitativos por CLAE para LGT e para a associação desta com metformina (LAKSHMI; REDDY, 2012; BADUGU, 2012; EL-BAGARY *et al.*, 2013; KAVITHA *et al.*, 2013;), quantificação de LGT na forma farmacêutica, no plasma e a matéria prima (EL-BAGARY *et al.*, 2012) e espectrofotometria por UV (EL-BAGARY *et al.*, 2013). Frente a esta informação, estudos na área de controle de qualidade, como métodos de doseamento indicativos de estabilidade e perfil de dissolução, fazem-se necessários para subsidiar o acompanhamento da qualidade do produto acabado.

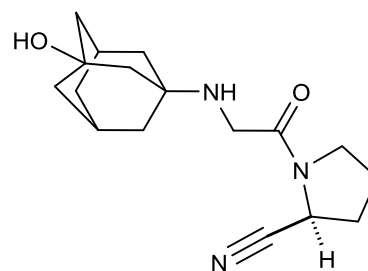
No caso de alguns outros membros da classe, representados na Figura 4, há relato para análise quantitativa de saxagliptina e seu principal metabólito em plasma humano, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (XU *et al.*, 2012). Cumar e colaboradores (2012) publicaram um estudo para quantificação de

saxagliptina e metformina em comprimidos por CLAE. Inturi e colaboradores (2011) desenvolveram técnica de quantificação de saxagliptina por CLAE para os comprimidos. Rao e colaboradores (2013) realizaram um estudo indicativo de estabilidade para quantificação tanto do insumo quanto dos comprimidos de saxagliptina.

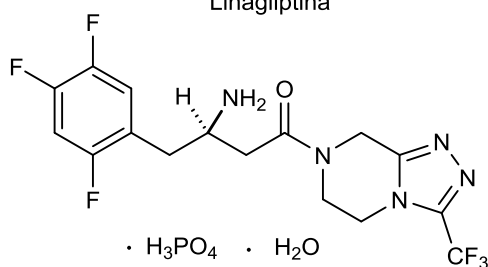
Figura 4. Estrutura química de algumas gliptinas (linagliptina, vildagliptina, fosfato de sitagliptina e saxagliptina)



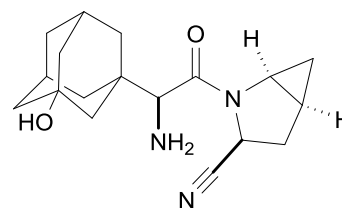
Linagliptina



Vildagliptina



Fosfato de Sitagliptina



Saxagliptina

Para a sitagliptina há um estudo de dissolução (RAVANELLO *et al.*, 2010) e validação de quantificação por espectrofotometria por UV para comprimidos de 25, 50 e 100 mg (RAVANELLO *et al.*, 2010; SEKARAN & RANI, 2010), validação por cromatografia líquida de somente sitagliptina, sitagliptina em mistura ternária com metformina e os produtos de degradação do fármaco (EL-BAGARY, *et al.*, 2011a), ou em associação somente com metformina (RIAD *et al.*, 2012). Lange e colaboradores (2012a) desenvolveram método de quantificação por eletroforese capilar, sendo esta uma análise rápida e com baixo consumo de reagentes e amostra. Em 2012 houve a publicação da quantificação de sitagliptina por CLAE e a avaliação da citotoxicidade dos produtos de degradação da sitagliptina (LANGE, 2012b).

El-Bagary e colaboradores (2011b) publicaram método de espectrofotometria por UV para determinação tanto de sitagliptina quanto de vildagliptina, em insumo e comprimidos. Somente para vildagliptina há método por CLAE (MALAKAR *et al.*, 2012; BOOVIZHIKANNAN; PALANIRAJANC, 2013) e a determinação do produto de degradação por espectrometria de massas (BARDEN *et al.*, 2012). Barden e colaboradores (2014) publicaram a quantificação de vildagliptina por eletroforese capilar e da associação de metformina e vildagliptina pelo mesmo método (BARDEN *et al.*, 2013).

4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LINAGLIPTINA

4.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento das propriedades físico-químicas de suas substâncias ativas é de fundamental importância para o desenvolvimento de fármacos e medicamentos (RODRIGUES; CARDOSO, 2005). Para tanto, é necessária a caracterização da matéria-prima para garantia das propriedades da mesma, lote a lote, incluindo a identificação das diferentes formas cristalinas do insumo (polimorfismos) (BARREIRO; FRAGA, 2001).

As Substâncias Químicas de Referência (SQR) são materiais de referência certificados, utilizadas na avaliação da conformidade dos insumos farmacêuticos e dos medicamentos (FB 5, 2010). São substâncias ou, em poucos casos, mistura de substâncias estabelecidas ou distribuídas por farmacopeias ou instituições públicas oficiais autorizadas, possuindo alto grau de pureza e uniformidade. São planejadas para uso em testes e ensaios químicos e físicos, nos quais suas propriedades são comparadas com as dos produtos que estão sendo analisados (FB 5, 2010). Os padrões de referência não compendiais são substâncias com elevado teor de pureza, que podem ser obtidos através de fornecedores privados e devem ser caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza.

A linagliptina SQR, utilizada neste trabalho, pode ser classificada como referencial não compendial, portanto sua caracterização foi realizada utilizando diferentes técnicas de análise, incluindo análise térmica, IV e RMN.

Dentre as análises térmicas, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica para análise de pureza de substâncias bem consolidada, sendo que a metodologia empregada está descrita na Norma ASTM E 928 (2003). O método avalia a pureza do composto por meio de uma análise do pico de fusão obtido, aplicando a lei da depreciação do ponto de fusão de Van't Hoff, que prevê a diminuição do ponto de fusão do composto puro devido à presença de impurezas (VAN DOOREN; MÜLLER, 1984).

A espectrofotometria no infravermelho fornece evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular (PAVIA *et al*, 2001). A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das micro-ondas. Juntamente com a

RMN pode auxiliar na identificação de compostos desconhecidos (CIENFUGOS; VAITSMAN, 2000; PAVIA *et al.*, 2001).

Segundo Hardy (2012) “RMN designa a interação ressonante do momento dipolo do núcleo magnético μ em um campo magnético externo com um campo eletromagnético”. Esta energia modifica o *spin* do núcleo, quando a amostra é exposta a um campo magnético para obtenção do momento magnético desta. Como cada núcleo tem um momento magnético diferente, é possível determinar que tipo de ligação química ele possui (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Outros método qualitativo empregado para a caracterização da amostra de LGT foi a espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV) por ser de simples execução sendo muito utilizado na área do controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões (WATSON, 2005). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que é um tipo de cromatografia que emprega pequenas colunas, preenchidas por materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões, tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de inúmeros compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. (WATSON, 2005; USP 36, 2013).

Nos últimos anos, a análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de UV e massas (CLUE-UV-EM) tem sido proposta como estratégia para encurtar o tempo de análise, informando ambos os íons não fragmentados e fragmentados, os quais podem ser consecutivamente utilizados para a quantificação e informações sobre os fragmentos de íon (BATEMAN *at al.*, 2007; CASTRO-PEREZ *et al.*, 2010). A análise por espectrometria de massas (EM) fornece simultaneamente medidas de massa exata, no caso de um analisador do tipo TOF, e informações de fragmentação através do recolhimento de dados, usando colisão paralela alternada de baixa e alta energia para aquisição do espectro.

**CARACTERIZAÇÃO DE LINAGLIPTINA COMO SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE
REFERÊNCIA POR TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Rita Elena de Abreu Engel, Amanda Thomas Barden, Sarah Chagas Campanharo,
Nadia Maria Volpato, Elfrides Eva Scherman Schapoval

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

ABSTRACT

Linagliptin (LGT) is a member of the class of gliptins that inhibits the enzyme dipeptidyl-peptidase-4. They are used to reduce glucose blood levels in patients with type 2 *Diabetes mellitus*. Due to its recent development and market launching, the LGT has no official compendium monograph, national or international, or available registries for qualitative determination of this drug. The objective of this work was to characterize LGT raw through thermal techniques, nuclear magnetic resonance, mass and infrared spectrometry, liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry to be used as a chemical reference substance. The range and melting point obtained are in accordance as described in the literature. The main groups of LGT molecule were observed by infrared spectroscopy and the molecular ion with ratio m/z 473.2555 was found by mass spectroscopy analysis. By using UV spectrophotometry it was possible to observe the maximum wavelengths absorption of the substance in different solvents. The chromatographic methods provide selectivity for LGT and proved to be useful to qualitative analysis. The proposed conditions have been successfully applied for identification and qualitative analysis of LGT as chemical reference substance, contributing to studies for this gliptin, as well as in quality control of medicines containing this drug.

Keywords: Linagliptin; Spectrometry; Chemical Substance Reference; Liquid chromatography, Nuclear magnetic resonance

5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E ESTUDO DE ESTABILIDADE: CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIOS E ESTUDO DE DANO À MEMBRANA CELULAR PELOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

5.1. INTRODUÇÃO

Segundo a RE 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003a), denominada de “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, “O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.” O método indicativo da estabilidade se enquadra na categoria II deste guia – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas e deve contemplar os parâmetros descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão

5.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo CBM-20A, utilizando coluna de fase reversa (C8). Para o desenvolvimento do método foram consideradas as publicações existentes para a classe do fármaco (Tabela 3).

Tabela 3. Métodos de análise para determinação de linagliptina comprimidos

Coluna/Detecção	Fase móvel	Referência
Chromosil C18 (250 x 4.6mm, 5µm) / 238 nm	ACN: Água: Metanol (25:50:25 v/v/v).	LAKSHMI; REDDY, 2012
Gemini C18 (250 x 4.6 mm; 5µm) / 241 nm	Metanol: Água (83:17 v/v) (pH 4,1)	BADUGU, 2012
Symmetry [®] cyanide (150 mm x 4.6 mm, 5 µm)/ UV 299 nm	Tampão fosfato de potássio (pH 4.6):ACN (20:80, v/v)	EL-BAGARY; ELKADY; AYOUB, 2012
Zodiac C18 (250 x 4.6 mm; 5µm)/ UV 248 nm	Tampão fosfato (pH 6,5):ACN (50:50 v/v)	THAKARE <i>et al.</i> , 2013
X Bridge C18 (100 x 4.6 mm; 5 µm)/ UV 240 nm	Tampão fosfato (pH 3.4):ACN (70:30 v/v)	SUJATHA; RAO, 2013
Chromosil C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm)/ UV 226 nm	Fosfato de potássio 0,02 M (pH 5 ajustado com ácido ortofosfórico 1%): ACN (70:30, v/v)	ARCHANA; SRIRAM; GAYASUDDIN, 2013
Associação de linagliptina e metformina		
BDS Hypersil C8 (250 x 4.6 mm, 5 µm) / UV 243 nm	ACN:Água: Metanol (25:50:25 v/v/v) (pH 4.1)	KAVITHA <i>et al.</i> , 2013
Symmetry [®] Waters C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) / UV 299 nm	Tampão fosfato de potássio (pH 4,6):Metanol (30:70 v/v)	EL-BAGARY <i>et al.</i> , 2013.
Hypersil C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)/ UV 233 nm	Tampão fosfato (pH 5.6,ajustado com ácido ortofosfórico): metanol: ACN (40:5:55 v/v/v)	SWAMY; BABA, 2013
Espectrofotometria de Ultravioleta		
UV/Vis 241 nm	Metanol: Água (50:50 v/v)	SEKHAR, 2013

5.1.2. Estudo de Estabilidade

O estudo de estabilidade é fundamental para avaliar a formação de possíveis produtos de degradação e avaliar se estes possuem alguma atividade que cause dano ao organismo (NUDELMAN, 1975). É necessário que se tenha um método que diferencie o composto principal dos produtos de degradação para determinar a estabilidade das amostras na rotina da indústria farmacêutica (BAKSHI; SINGH, 2002).

De acordo com o ICH (2003) a especificidade do método pode ser demonstrada através da comparação dos resultados da amostra com amostras submetidas a condições de estresse relevantes como: luz, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação. Os estudos devem ocorrer na forma acelerada e de longa

duração. O primeiro é realizado para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto farmacêutico pelo uso de condições de estocagem forçadas. Os estudos de longa duração são projetados para estabelecer ou confirmar a vida média projetada e recomendar as condições de estocagem (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade da LGT foi realizado através da degradação forçada do fármaco em meio básico com aquecimento, para acelerar a degradação, a fim de estabelecer métodos analíticos indicativos de estabilidade. Com isso é possível determinar a ordem da reação de degradação e a velocidade que esta ocorre.

Além disso, a amostra degradada sob estas condições de degradação foi analisado em UPLC/MS, a fim de sugerir a identidade dos possíveis produtos e rotas de degradação tanto do fármaco extraído do produto (FA) quanto da SQR.

STABILITY-INDICATING LC ASSAY FOR ANALYSIS OF LINAGLIPTIN IN TABLETS AND STUDY OF ALKALINE DEGRADATION KINETICS WITH IDENTIFICATION OF DEGRADATION PRODUCTS AND ASSESSMENT OF CELL MEMBRANE DAMAGE FOR ITS PRODUCTS.

Rita Elena de Abreu Engel, Amanda Thomas Barden, Nathalie Ribeiro Wingert,
Juliana Maria de Mello Andrade, Sarah Chagas Campanharo, Natália Olegário,
Nadia Maria Volpato, Elfrides Eva Scherman Schapoval

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

ABSTRACT

Linagliptin (LGT) is a member of the class of gliptins that inhibits the enzyme dipeptidyl-peptidase-4. They are used to reduce glucose blood levels in patients with type 2 *Diabetes mellitus*. Due to its recent development and market launching, the LGT has no official compendium monograph, national or international, or available registries for qualitative and quantitative determinations of this drug. So, the objective of this work was to develop a LC method to characterize LGT in tablet dosage form containing 5 mg, evaluating the kinetics of degradation of LGT (standard and sample) and determining the possible cell membrane damage of drug degradation products in mononuclear cells after identify them. A simple and stability-indicating reversed-phase liquid chromatography method was optimized and validated according to International Conference on Harmonization acceptance criteria for specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and system suitability. A C8 analytical column (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m) was operated at 30 °C with a mixture of triethylamine 1.0% and acetonitrile (80:20, v/v), adjusted to pH 4.5 with orthophosphoric acid, at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹ and detection at 293 nm. The excipients did not interfere in the determination of LGT. Furthermore, in forced degradation studies, the effects of acid and basic conditions using 1.0 M HCl and 1.0 M NaOH, respectively, oxidation, exposure to UV-A and UV-C light and temperature 60 °C were investigated, and no interference in the drug peak was observed. The kinetics of degradation in basic medium under heating at 60 °C was determined and both standard and sample obtained zero order kinetic with constant (k) equal to 0.14 h and 0.15 h, $t_{1/2}$ equal to 3.64 h and 3.26 h and coefficient of determination equal to 0.9889 and 0.9936 for standard and sample, respectively. The cell membrane damage of LGT at 100 μ g mL⁻¹ and the formed products by its degradation were evaluated. At the evaluated concentration and at forced degradation until 50% and 100% of the tablets, both UV-C light and alkaline conditions, no cell damage was verified. The identification of the main degradation products were suggested. The chromatographic separation was obtained within 6.3 min and the response was linear in the range of 1–50 μ g mL⁻¹ ($r= 0.9998$) showed significant linear regression and non-significant linearity deviation by analysis of variance. The method was precise (intra-day relative standard deviation (RSD) and inter-day RSD values < 1.10%), accurate (mean recovery = 98.6%), and robust. Limit of detection and limit of

quantitation were 0.14 and 0.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The proposed conditions were successfully applied for the quantitative analysis of LGT in tablet dosage form, which will help improving the drug quality control and contribute to stability studies of this gliptin.

Keywords: Linagliptin; Quality control; Stability-indicating method; Kinetics of degradation; Cell damage

**6. CAPÍTULO III – TESTE DE DISSOLUÇÃO PARA OS COMPRIMIDOS DE
LINAGLIPTINA**

6.1. INTRODUÇÃO

O teste de dissolução é considerado uma importante ferramenta para caracterização de um produto na área farmacêutica. O mesmo fornece informações úteis tanto na pesquisa e desenvolvimento como na produção e controle de qualidade de formas farmacêuticas (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, p.96).

No desenvolvimento de um método de dissolução, muitas são as variáveis a serem analisadas que influenciam a técnica e a reprodutibilidade dos resultados do ensaio (MARCOLONGO, 2003; STORPIRTIS *et al*, 2004). Neste trabalho foram avaliados diferentes aparatos (pás ou cestas), em diferentes velocidades e meios de dissolução, bem como parâmetros relacionados ao meio, como volume, presença de gases, pH. Os critérios de aceitação do teste estão de acordo com os preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010).

A LGT é um fármaco que não possui classificação biofarmacêutica, sendo sugerida como classe I (FDA, 2011; TRADJENTA, 2011) pela própria Boehringer Ingelheim®, laboratório que lançou a molécula, indicando que a dissolução é um fator muito pouco provável de ser limitante na absorção (TGA, 2011). De acordo com a classificação do FDA (2011) o fármaco é ligeiramente solúvel em água (0,9 mg.mL⁻¹), solúvel em metanol (60 mg.mL⁻¹), moderadamente solúvel em etanol (cerca de 10 mg.mL⁻¹), ligeiramente solúvel em isopropanol (<1 mg.mL⁻¹) e ligeiramente solúvel em acetona (cerca de 1 mg.mL⁻¹).

Os fármacos podem ser classificados de acordo com a solubilidade e permeabilidade, constituindo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A Anvisa (BRASIL, 2003b) possui recomendações para realização de testes de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI), e o conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética deve ser considerado para a definição de especificações de dissolução, visando à aprovação do registro do medicamento.

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, da dissolução ou solubilização do fármaco em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal.

Devido à natureza crítica dos dois primeiros, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*. Com base nestas considerações gerais, os ensaios de dissolução *in vitro* para FFSOLI, tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento depois de determinadas alterações (BRASIL, 2003b).

Fármacos com alta solubilidade podem ser incluídos na resolução RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011 da ANVISA que dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Esta resolução é aplicável a medicamentos genéricos e similares, bem como a medicamentos novos de liberação imediata de uso oral candidatos à bioisenção baseada no sistema de classificação biofarmacêutica, formulados com excipientes que não apresentem impacto sobre a biodisponibilidade e que apresentem rápida dissolução *in vitro*.

Por ser possivelmente de classe I (FDA, 2011; TRADJENTA, 2011), a LGT poderia ser incluída no programa de bioisenção (FDA, 2000; EMEA, 2009; BRASIL, 2011b). Para os fármacos candidatos, propõe-se a substituição dos estudos de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência por ensaios *in vitro*.

Os estudos foram conduzidos com a quantificação do fármaco, tanto por espectrofotometria de UV/VIS, como por CLAE, com detector de arranjo de diodos e a análise estatística realizada para uma possível intercambialidade entre os dois métodos propostos.

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF DISCRIMINATING METHOD OF
LINAGLIPTIN DISSOLUTION IN TABLETS USING HPLC AND ULTRAVIOLET
DETECTION AND APPLICATION OF BIOWAIVER PARAMETERS**

Rita Elena de Abreu Engel, Amanda Thomas Barden, Sarah Chagas Campanharo,
Natália Olegário, Nadia Maria Volpato, Elfrides Eva Scherman Schapoval

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

ABSTRACT

Linagliptin (LGT) is used to reduce glucose blood levels in patients with type 2 *Diabetes mellitus*. As physico-chemical properties, has high solubility in water. So can be applied to this drug the proposed conditions into biowaiver guide. The aim of the present study was to develop and validate a dissolution test for linagliptin 5 mg coated tablets. After evaluated sink conditions, filters and stability of the drug, the most discriminatory dissolutions conditions were achieved using USP apparatus 1 (basket) at 75 rpm stirring speed and 900 mL of citrate buffer as dissolution medium. The conditions proposed by the biowaiver guide were also applied to drug, using USP apparatus 2 (paddle) at 100 rpm stirring speed and 900 mL of HCl 0,1 M, pH 4,5 buffer or pH 6,8 phosphate buffer as dissolution medium. The UV spectrophotometric method at 293 nm was validated for linagliptin determination. The parameters such as specificity, linearity, accuracy, precision and robustness were evaluated according international guidelines. Linagliptin was assayed by HPLC method previously validated. the results were compared using the Student's t-test. The proposed method can be applied for quality control of this gliptin, since there is no official monograph for this drug. According to the results, the drug may be a biowaiver candidate.

Keywords: Linagliptin; Dissolution test; UV spectrophotometric method; Biowaiver; Quality control.

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL

O desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos para avaliação da qualidade de fármacos é de suma importância para a rotina do controle de qualidade na indústria farmacêutica (SWARTZ; KRULL, 1998). A LGT possui poucas publicações na área de controle de qualidade referentes à quantificação do fármaco (LAKSHMI; REDDY, 2012; BADUGU, 2012; EL-BAGARY *et al.*, 2012; THAKARE *et al.*, 2013; KAVITHA, 2013; EL-BAGARY *et al.*, 2013; SEKHAR, 2013) e nenhuma com estudos indicativos de estabilidade, sendo este o primeiro trabalho com estudo de dissolução dos comprimidos, avaliação da cinética de degradação do fármaco e sugestão dos produtos de degradação formados.

A LGT é um fármaco utilizado para o tratamento de DM tipo 2, doença metabólica que atinge milhões de pessoas no mundo (OMS, 2013). Este fármaco é classificado no grupo das gliptinas, nova classe de medicamentos que surgiu em 2007 com o lançamento da sitagliptina (NEUMILLER; SETTER, 2012). O diferencial da LGT frente aos outros integrantes da classe é a sua eliminação biliar (GERICH, 2010), em que as concentrações plasmáticas e possível toxicidade do fármaco não são afetadas pela insuficiência renal, comum em diabéticos (NEUMILLER; SETTER, 2012).

A SQR utilizada neste trabalho foi devidamente caracterizada por meio dos métodos por espectrometria de IV, RMN¹H, análise térmica (ponto e faixa de fusão e DSC) e espectroscopia de massas. Os resultados obtidos nas análises espectroscópicas e de RMN¹H estão de acordo com as características da molécula de LGT, assim como as análises térmicas forneceram informações próximas ao descrito na literatura (ECKHARDT, 2007), confirmando a presença de LGT na amostra testada.

Posterior à identificação da SQR, métodos qualitativos foram empregados na LGT na forma farmacêutica comprimido, obtida no comércio local para identificação. Dentre os métodos disponíveis optou-se pela espectroscopia por UV, CLAE, UPLC e espectroscopia de massas. Os espectros de UV gerados são semelhantes à SQR, assim como os tempos de retenção obtidos nas técnicas cromatográficas utilizadas. A caracterização é necessária para garantir a presença do fármaco em questão na amostra, assim como utilizar estas informações nos outros estudos de quantificação. A presença de LGT foi confirmada na amostra de maneira satisfatória.

A partir da caracterização e identificação da SQR e amostra de trabalho, métodos analíticos foram desenvolvidos e devidamente validados de acordo com os guias nacionais e internacionais (ICH, 2005; BRASIL, 2003a; USP 36, 2013). As condições utilizadas foram: fase móvel constituída por água (pH 4,5 1,0% de TEA): ACN (80:20, v/v), vazão de 1,2 mL.min⁻¹, temperatura do forno de 30 °C, coluna C8 Agilent Zorbax e tempo de retenção em 6,3 minutos. Durante a otimização buscou-se um método que cumprisse os parâmetros de adequabilidade do sistema. O método mostrou-se específico, linear, preciso, exato, robusto nas condições avaliadas e indicativo de estabilidade, já que não houve interferência dos produtos de degradação na quantificação do fármaco.

Com as informações geradas no estudo de estabilidade e a sensibilidade do fármaco nas condições alcalina e fotolítica por radiação de UV-C, investigou-se a cinética de degradação do fármaco na condição alcalina. Nesta investigação concluiu-se, a partir dos coeficientes de determinação dos gráficos da concentração logaritmo da concentração e inverso da concentração, que tanto SQR quanto amostra de LGT possuem cinética de primeira ordem de degradação.

Estes produtos de degradação formados nos estudos de estresse puderam ser sugeridos com o auxílio da técnica de UPLC/ DAD/ ESI/ QTOF/ MS. Os padrões de fragmentação da amostra foram obtidos, assim como da relação massa carga dos produtos de degradação majoritários obtidos das degradações alcalina e fotolítica por radiação UV-C. Produtos diferentes foram formados nas duas condições e as estruturas químicas das moléculas formadas foram sugeridas, porém o isolamento e a análise destes PD por RMN¹H e RMN¹³C são necessários para confirmar as estruturas moleculares.

Havia a necessidade de informações sobre o possível citotoxicidade por dano à membrana celular que estes produtos de degradação poderiam gerar. Para tal, foi realizado o teste de dano à membrana, utilizando a técnica por LDH, em que não houve diferenças significativas das amostras utilizadas (LGT sem degradação, degradação alcalina e fotolítica por radiação UV-C) em relação ao controle negativo (p>5%).

O teste de dissolução desenvolvido e validado para os comprimidos de LGT, utilizando o método por CLAE e UV como ferramentas de quantificação, mostrou-se discriminativo para a rotina de controle de qualidade lote a lote. O teste de

dissolução otimizado e validado utilizou o meio citrato pH 3,5, aparato cesta, volume de meio de 900 mL, velocidade de 75 rpm e temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. O método por UV empregado na quantificação da dissolução foi validado, mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto nas alterações avaliadas. Não houve diferença estatística entre os dois métodos quantitativos, podendo estes serem considerados intercambiáveis.

Por ser um fármaco altamente solúvel e possivelmente de classe I (FDA, 2011; TRADJENTA, 2011), os protocolos de estudos de bioisenção foram aplicados para os comprimidos (FDA, 2000; EMEA, 2009; BRASIL, 2011b). Nos três meios testados, em diferentes pHs, com volume de meio de 900 mL e aparato pá com velocidade de 100 rpm, a substância ativa obteve dissolução acima de 85 % em 15 minutos de análise. Por ser tratar de um fármaco para o tratamento de uma doença metabólica endêmica (OMS, 2013), sugere-se a inclusão da LGT na lista de fármacos sujeitos à bioisenção.

Acredita-se que o trabalho cumpriu com os objetivos propostos, servindo como uma ferramenta para o controle de qualidade analítico desta gliptina, além de fornecer informações sobre a estabilidade do fármaco. Os estudos de dissolução discriminativos são essenciais para o controle lote a lote durante a produção na indústria farmacêutica, podendo ser detectados problemas que possam interferir na absorção e posterior efeito sistêmico do fármaco.

REFERÊNCIAS

ACD LABS. **Software: ACDChemSketch**, versão 12.01, 2010. Disponível em <http://www.acdlabs.com/>

ANDRADE, J.M.M.; PASSOS, C. dos S.; DRESCH, R.R.; KIELING-RUBIO, M.A.; MORENO, P.R.H.; HENRIQUES, A.T. Chemical Analysis, Antioxidant, Antichemotactic and Monoamine Oxidase Inhibition Effects of some Pteridophytes from Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, *in press*.

ARCHANA, M.; SRIRAM, N., GAYASUDDIN, Md. Method development and validation of RP-HPLC method for determination of new antidiabetic agent linagliptin in bulk and in pharmaceutical formulation. **IJMCA**, 2013, v. 3, n. 1, p. 1-5.

ASTM E 928, 2003. **Standard Test Method for Determination of Purity by Differential Scanning Calorimetry**. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003.

BADUGU, LR. A Validated RP-HPLC Method for the Determination of Linagliptin. American **Am. J. PharmTech Res**, 2012. v. 2, n. 4, p. 462-470.

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

BARCELÓ, A.; RAJPATHAK, S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. **Pan Am J Public Health.**, 2001, v. 10, n.5.

BARDEN, Amanda Thomas. Dissertação de mestrado. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de Vildagliptina em comprimidos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

_____, Amanda Thomas; SALAMON, Bárbara; SCHAPOVAL, Elfrides .Eva; STEPPE, Martin. Stability-indicating RP-LC method for the determination of vildagliptin and mass spectrometry detection for a main degradation product. **J Chromatogr Sci.**, 2012, v. 50, n. 5, p. 426-32.

_____, Amanda Thomas; PICCOLI, Bruna Lopes; VOLPATO, Nadia Maria; STEPPE, Martin. A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets. **Anal. Methods**, 2013, v.5, p. 5701-5708.

_____, Amanda Thomas; PICCOLI, Bruna Lopes; VOLPATO, Nadia Maria; SCHAPOVAL, Elfrides Eva Scherman; STEPPE, Martin. Capillary zone electrophoresis for determination of vildagliptin (a DPP-4-inhibitor) in pharmaceutical formulation and comparative study with HPLC. **Pharmazie**, 2014, v. 69, n. 2, p. 86-91.

BARNETT, A. H. Linagliptin, a Novel Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor with a unique Place in Therapy. **Advances in Therapy**, 2011, v. 28, n. 6, p. 447-459.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 1ª. Edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

BATEMAN, Kevin P, CASTRO-PEREZ, Jose, WRONA, Mark, SHOCKCOR, John P., YU, Kate, OBALLA, Renata, NICOLL-GRIFFITH, Deborah A. MSE with mass defect

filtering for in vitro and in vivo metabolite identification. **Rapid Commun Mass Spectrom**, 2007, v. 21 n. 9, p. 1485–1496.

BLECHS.; LUDWIG-SCHWELLINGERE., GRÄFE-MODYE.U.; WITHOPF, B.; WAGNER, K. The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin in humans. **Drug Metab Dispos.**, 2010, v. 38, p. 667–678.

BOOVIZHIKANNAN, Thangabalan; PALANIRAJANC, Vijayaraj Kumar. RP-HPLC determination of vildagliptin in pure and in tablet formulation. **Journal of Pharmacy Research**, 2013, v. 7, p.113-116.

BRANCHTEIN, L.; MATOS, M. C. G. **Antidabéticos**. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (Ed.). *Farmacologia Clínica - Fundamentos da terapêutica racional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. Antidabéticos, p.832-844, 2004

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução **RE nº 1, de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em 17/02/2014.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução **RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 2003a. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 28/06/2012.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA Resolução **RE nº 901, de 29 de maio de 2003**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (FFSOLI). Diário Oficial da União, Brasília, 2003b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/recomenda/recomenda_dissolucao2.pdf>. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

_____. Farmacopeia Brasileira, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010, 546p.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução **RDC Nº. 31, de 11 de agosto de 2010**. Realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/89d63480474597439fb9df3fbc4c6735/RDC_31_2010_Dispos%C3%B5e%2Bsobre%2Ba%2Brealiza%C3%A7%C3%A3o%2Bdos%2BEstudos%2Bde%2BEquival%C3%Aancia%2BFarmac%C3%AAutica%2Be%2Bde%2BPerfil%2Bde%2BDissolu%C3%A7%C3%A3o%2BComparativo.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 17/02/2014.

_____. Suplemento – Seção 1. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 61, 04 jul. 2011a.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada **RDC Nº 37, de 3 de agosto de 2011**. Guia para

isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2011b Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c626d0040cb51e6952eb51b0133649b/rdc0037_03_08_2011.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 17/02/2014.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CASTRO-PEREZ, Jose M.; KAMPHORST, Jurre; DeGROOT, Jeroen; LAFEBER, Floris; GOSHAWK, Jeff; YU, Kate; SHOCKCOR, John P.; VREEKEN, Rob J.; HANK'SEMEIER, Thomas. Comprehensive LC-MSE Lipidomic Analysis using a Shotgun Approach and Its Application to Biomarker Detection and Identification in Osteoarthritis Patients. **J Proteome Res**, 2010 v. 9 n.5 p. 2377–2389.

CHAVES, H.K. Dissertação de mestrado: **O efeito do substituinte no anel piperidina na reatividade de pré-catalizadores do tipo $[RuCl_2(PPh_3)_2(4-CH_2X-pip)]$ em ROMP**. 78f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

COCHRAN, W.G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, 1941, v. 11, n. 1, p. 47–52.

CULBERTSON, H.; DECIUS, J. C.; CHRISTENSEN, B.E. Quinazolines. XIII. A Study of the Infrared Spectra of Certain Quinazoline Derivatives. **J. Am. Chem. Soc.**, 1952, v. 74 n. 19, p. 4834–4838.

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

DEL PRATO S, BARNETT AH, HUISMAN H, NEUBACHER, D., WOERLE, H.J.; DUGI, K.A.. Effect of linagliptin monotherapy on glycemic control and markers of beta-cell function in patients with inadequately controlled type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **Diabetes Obes Metab.**, 2011, v. 13, p. 258–267.

ECKHARDT, Matthias; LANGKOPF, Elke; MARK, Michael; TADAYYON, Moh; THOMAS, Leo; NAR, Herbert; PFRENGLE, Waldemar; GUTH, Brian; LOTZ, Ralf; SIEGER, Peter; FUCHS, Holger; HIMMELSBACH, Frank . 8-(3-(R)-Aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a Highly Potent, Selective, Long-Acting, and Orally Bioavailable DPP-4 Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. **J. Med. Chem.**, 2007, v. 50, n. 26, p. 6450–6453.

ECKHARDT, Matthias; HAUDEL, N; HIMMELSBACH, F.; LANGKOPF, E.; NAR, H.; MARK, M.; TADAYYON, M.; THOMAS, L.; GUTH, B.; LOTZ, R. 3,5-Dihydroimidazo[4,5-d]pyridazin-4-ones: a class of potent DPP-4 inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, 2008, v. 18, p. 3158–62.

EFPIA .European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. **A iniciativa dos medicamentos inovadores**. Bruxelas, 2007.

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**, 2011a, v. 85, p. 673–680.

_____, R.I.;ELKADY, E. F.; AYOUB, B. M. Spectrophotometric Methods for the Determination of Sitagliptin and Vildagliptin in Bulk and Dosage Forms. **Int J Biomed Sci**, 2011b, v. 7, n. 1, p. 55-61.

_____, R.I., ELKADY, E.F.; AYOUB, B.M. Liquid Chromatographic Determination of Linagliptin in Bulk, in Plasma and in its Pharmaceutical Preparation. **Int J Biomed Sci**, 2012, v. 8, n. 3, p. 209-14.

_____, 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. **Int J Biomed Sci**, 2013, v. 9, n. 1, p. 41-47.

EMA. European Medicines Agency. **Guideline on the investigation of bioequivalence**, 2009. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003011.pdf>. Acesso em 07 de janeiro de 2014.

EMA. European Medicines Agency. **Trajenta – linagliptin**, 2012. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002110/WC500115748.pdf>. Acesso em 20 de outubro de 2013.

FARMACOPEIA Brasileira, 5ª Ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

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

_____. Food and Drug Administration. **Highlights of prescribing information**. Revisado em maio de 2011. Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/201280s005lbl.pdf>. Acesso em 08 de outubro de 2013.

_____. Food and Drugs Administration. **Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System**, 2000. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2014.

FORST, T.; UHLIG-LASKE, B.; RING, A.; GRAEFE-MODY, U.; FRIEDRICH, C.; HERBACH, K.; WOERLE, H.J.; DUGI, K.A. Linagliptin (BI 1356), a potent and selective DPP-4 inhibitor, is safe and efficacious in combination with metformin in patients with in adequately controlled type 2 diabetes. **Diabet Med.**, 2010, v. 27, p.1409–1419.

GALLWITZ, Baptist. Linagliptin—A Novel Dipeptidyl Peptidase Inhibitor for Type 2 Diabetes Therapy. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**, 2012, v. 5, p. 1–11.

GERICH, J. DPP-4 inhibitors: What may be the clinical differentiators? **Diabetes Res Clin Pract.**, 2010, v. 90 p.131–140.

GOODMAN e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hill, c2003. xxi, 1647 p.

GRAEFE-MODY, Ulrike; RETLICH, Silke; FRIEDRICH Christian. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Linagliptin. **Clinical Pharmacokinetics**, 2012, v. 51, n. 7, p 411-427

GraphPad Prism version 5.00 for Windows, **GraphPad Software**, San Diego California USA, www.graphpad.com

HANSON, W. A. **Handbook of dissolution testing**. 2. ed. Oregon: Aster Publishing Corporation, 1991. p. 159.

HARDY, Edme H. **NMR Methods for the Investigation of Structure and Transport**. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2012.

HARRELL, Charles.; BOWDEN, Royce; GHOSH, Biman. K. **Simulation using Promodel**, 3rd ed. Boston: McGraw-Hill, 2000. 603 p.

HE, Yan-Ling; SADLER, Brian M.; SABO, Ron; BALEZ, Sebastien; WANG, Yibin; CAMPESTRINI, Joelle; LAURENT, Aziz; LIGUEROS-SAYLAN, Monica; HOWARD, Dan. The Absolute Oral Bioavailability and Population-Based Pharmacokinetic Modelling of a Novel Dipeptidylpeptidase-IV Inhibitor, Vildagliptin, in Healthy Volunteers. **Clinical Pharmacokinetics**, 2007, v. 46, n. 9, p 787-802

HERMAN, G.A.; STEIN, P.P.; THORNBERRY, N.A.; WAGNER, J.A. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin. **Clin Pharmacol Ther**, 2007; v. 81, p. 761–767.

HORIE, Yoshiharu; KANADA, Shigeto; WATADA, Hirotaka; SARASHINA, Akiko; TANIGUCHI, Atsushi; HAYASHI, Naoyuki; GRAEFE-MODY, Eva U.; WOERLE, Hans-Juergen; DUGI, Klaus A. Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Tolerability Profiles of the Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Linagliptin: A 4-Week Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIa Study in Japanese Type 2 Diabetes Patients. **Clinical Therapeutics**, 2011, v. 33, n. 7, p. 973–989.

HUYNH-BA, Kim. **Handbook of stability testing in pharmaceutical development**. Springer, Nova Iorque, 2009.

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

IDF. International Diabetes Federation. **The IDF Diabetes Atlas**. Fifth Edition. Brussels, 2011

INTURI, Srikanth; INTURI, Ravikanth; TAGARAM Israel Kumar. Validated novel LC determination of saxagliptin in pure bulk and pharmaceutical dosage forms. **IJPRD**, 2011; v. 3, n.8, p. 45 – 52.

JOHNSON, Richard. Miller and Freund's probability and statistics for engineers, 5th ed., 1994. **Englewood Cliffs**, NJ: Prentice-Hall.

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.**, 2013, v. 5, n.1, p. 230-235.

KAWAMORI, R.; INAGAKI, N.; ARAKI, E.; WATADA, H.; HAYASHI, N.; HORIE, Y.; SARASHINA, A.; WOERLE, H.; DUGI, K. A. Linagliptin monotherapy improves glycemic control in Japanese patients with T2DM over 12 weeks. **Diabetes**. v. 59, (Suppl 1), p. 696, 2011. Abstract.

LAKSHMI, B; Reddy, T.V.; A novel RP-HPLC method for the quantification of linagliptin in formulations. **Journal of Atoms and Molecules**, 2012, v. 2, n. 2, p.155–164.

LANGE, A. D. C.; GASPERIN; F. T.; BARTH, A.B.; TODESCHINI, V.; VOLPATO, N. M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Application of Factorial Design and Study of Photodegradation Kinetics for the Determination of Sitagliptin by Capillary Electrophoresis. **Current Analytical Chemistry**, 2012a, v. 8, n. 1, p. 116-123.

_____, A. D. C.; GASPERIN; F. T.; PASSOS, C.S.; TODESCHINI, V.; VOLPATO, N. M.; SCHAPOVAL, E. E. S. Stability-Indicating LC Assay with Determination of System Suitability Limits by a Robustness Test for Sitagliptin in Tablets and Assessment of Cytotoxicity for Degradation Products. **Current Pharmaceutical Analysis**, 2012b, v. 8, p. 360-367.

_____, A. D. C. Tese de doutorado. **Sitagliptina: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos aplicáveis a estudos de estabilidade**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

LEIGH, B. Clark; IGNACIO, Tinoco Jr. Correlations in the ultraviolet spectra of the purine e pyrimidine bases. **Journal of the American Chemical Society**, 1965, v.87, n.1, p.11-15.

LEWIN, A. J.; ARVAY, L.; LIU, D.; PATEL, S.; WOERLE, H.J. Safety and efficacy of linagliptin as add-on therapy to a sulphonylurea in inadequately controlled type 2 diabetes. **Diabetologia**. v. 53, (Suppl 1): S326, 2010. Abstract.

LISTER, J.H.; JONES, R.L.; LAWLEY, P.D.; HITCHINGS, G.H.; ELION, G.B. **The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Fused Pyrimidines: The Purines**. Parte 2, volume 24. Editora John Wiley & Sons, 655 p.

LONG, Willian J.; HENDERSON Jr., John W. Chromatography of Nitrogen-Containing Compounds Without Triethylamine. **Agilent Technologies**. Janeiro de 2007. Disponível em <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-6068EN.pdf>>. Acesso em 08 de outubro de 2013.

MALAKAR, Aparajita; BOKSHI, Bishwajit; NASRIN, Dilruba. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of vildagliptin from tablet dosage form. **International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences**, 2012, v. 1, n. 1, Serial 2.

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

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

MARTINEZ, V.; CORSINI, E.; MITJANS, M.; PINAZO, A.; VINARDELL, M.P. Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using diferente *in vitro* endpoints as alternatives to the *in vivo* assays. **Toxicol. Left**, 2006, v. 164, p. 259-267.

MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments**. 5th ed. New York : John Wiley, c2001. xii, 684 p.

NEUMILLER, J. J.; SETTER, S. M. Review of Linagliptin for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics.**, 2012, v. 34, n. 5.

NUDELMAN, N.S. **Estabilidad de Medicamentos**. 1. Ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1975, p. 2-22.

OLIVEIRA, E.A.; LABRA, M.E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. **Cad. Saúde Pública**, 2006, Rio de Janeiro, v.22, n. 11, p.2379-89.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Diabetes**. Fact sheet n° 312. Agosto de 2011.

_____. Organização Mundial da Saúde. Diabetes programm. Facts and figures. Prevalence data. Disponível em <http://www.int/diabetes/facts/world_figures/en/>. Acesso em 20 de julho de 2013.

_____. Organização Mundial da Saúde. **Sobre Diabetes**. Disponível em <http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/>. Acesso em 20 de julho de 2013.

ONGLYZA (Saxagliptin) **Mechanism of Action** (MAO). Disponível em <<https://www.onglyza-hcp.com/hcp/about/moa.aspx>>. Acesso em 20 de fevereiro de 2014.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, saúde física e saúde**. Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília, 2003.

OWENS, D. R.; SWALLOW, R; DUGI, K. A.; WOERLE, H. J. Efficacy and safety of linagliptin in persons with type 2 diabetes inadequately controlled by a combination of metformin and sulfonylurea: a 24-week randomized study. **Diabet Med.**, 2011, v. 28, p. 1352–1361.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3rd ed. United States of America: Brooks / Cole, c2001. ca. 600 p.

PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. **Tablas para la elucidacion structural de compuestos orgânicos por metodos espectroscópicos**, 2 ed. Madrid: Alhambra, 1985.

RAO, P. Srinivasa; CHANDRAN, D. Rama; MURALI, K.; SRINIVASU, S. Stability indicating isocratic reverse phase HPLC method with PDA detector for the estimation of saxagliptin in bulk drugs and in its formulation. **International Journal of Pharma Sciences**, 2013, v. 3, n. 5, p. 333-342.

RAVANELLO, A.; DADALT, G.; TORRES, B.G.S.; HURTADO, F.K.; MARCOLINO, A. I.P.; ROLIM, C. M.B. Development and validation of an UV-spectrophotometric method for the dissolution studies of sitagliptin tablets. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2010, v. 29, n. 6, p. 962-967.

RIAD, S. M.; REZK, M. R.; MAHMOUD, G. Y.; ALEEM, A. E. B A. Spectrophotometric determination of sitagliptin and metformin in their pharmaceutical formulation. **Pharmacie Globale (IJCP)**, 2012, v. 5, n. 1, p. 1-4.

RODRIGUES, Patrik Oening; CARDOSO, Teófilo Fernando Mazon, SILVA, Marcos Antonio Segatto; MATOS, Jivaldo do Rosário. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, 2005, v. 24, n. 3, p. 383-387.

ROWE, Raymond C.; SHESKEY, Paul J.; WELLER, Paul J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London, England: The Pharmaceutical Press, 2009. xxvi, 888 p.

SARASHINA, A.; SESOKO, S; NAKASHIMA, M; HAYASHI, N.; TANIGUCHI, A.; HORIE, Y.; GRAEFE-MODY, E. U.; WOERLE, H. J.; DUGI, K.A. Linagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor in Development for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Single and Multiple Escalating Doses in Healthy Adult Male Japanese Subjects. **Clinical Therapeutics**, 2010, v. 32, n. 6., p. 1188-204.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Sociedade Brasileira de Diabetes. 3. ed., Itapevi/SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Tudo Sobre Diabetes**. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/tudo-sobre-diabetes>>. Acesso em 20 de julho de 2013.

SCHEEN, A.J. DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes: A critical review of head-to-head trials. **Diabetes & Metabolism**, 2012, v. 38, p. 89-101.

SEKARAN, C. B.; RANI, A. P. Development and validation of spectrophotometric method for the determination of dpp-4 inhibitor, sitagliptin, in its pharmaceutical preparations. **Ecl. Quím**, 2010, v. 35, n. 3, p. 45-53.

SEKHAR, C.K.; SUDHAKAR, P.; RAO, T.M.; BABU, P.V.; MANIKANTA, K.A. A new UV-method for determination of linagliptin in bulk and pharmaceutical dosage form. **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**, 2013, v. 2, n. 4, p. 1-6.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Exp Toxicol Pathol**, 2003, v. 54, p. 313-318.

SHIMADZU. **Differences Between Using Acetonitrile and Methanol for Reverse Phase Chromatography**. Disponível em <<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/35/35lab.html>>. Acesso em 08 de outubro de 2013.

SIGMA-ALDRICH. **Triethylamine for HPLC, ≥99.5%**. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/17924?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em 08 de outubro de 2013.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2007. 490 p.

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.

_____, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

_____, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUJATHA, K.; RAO, J.V.L.N. Seshagiri. A New RP-HPLC Method for the Estimation of Linagliptin in Tablet Dosage Forms. **Indo American Journal of Pharm Research.**, 2013, v. 3, n.10, p. 8376-8381.

SWAMY, A. Janardhan; BABA, K. Harinadha. Analytical Method development and Method validation for the simultaneous estimation of Metformin HCL and Linagliptin in Bulk and tablet Dosage Form by RP-HPLC Method. **International Journal of Pharmacy**, 2013, v. 3, n. 3, p. 594.

SWARTZ, M.R.; KRULL, I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, 1998, v. 2, n. 1, p. 12-20.

TASKINEN, M. R.; ROSENSTOCK, J., TAMMINEN, I., KUBIAK, R.; PATEL, S.; DUGI, K. A.; WOERLE, H. J. Safety and efficacy of linagliptin as add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo controlled study. **Diabetes Obes Metab.**, 2011, v. 13, p. 65–74.

TGA. Therapeutical Goods Administration. **Australian Public Assessment Report for Linagliptin**, 2011. Disponível em <<http://www.tga.gov.au/pdf/auspar/auspar-trajenta.pdf>>. Acessado em 04 de fevereiro de 2014.

THAKARE, D.; VIKAS, P.; RAMESH, K.; VIJAY, J.; SEKHAR, C.K. A new RP–HPLC method for simultaneous estimation of metformin HCl and linagliptin in tablet dosage form. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.**, 2013, v. 2, n. 3, p. 1332-1341.

THERMO Scientific. **Triethylamine (TEA)**. Disponível em <<http://www.piercenet.com/product/triethylamine-tea>>. Acesso em 08 de outubro de 2013.

TORNIO, A.; NIEMI, M. NEUVONEN, P.J.; BACKMAN, J.T. Drug interactions with oral antidiabetic agents: pharmacokinetic mechanisms and clinical implications. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2012, v. 33, n.6, p. 312-322.

TRADJENTA (linagliptin) [package insert]. Ridgefield, Conn: Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc; 2011.

UNITED States Pharmacopeia 36 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

VAN DOOREN, A.A.; MÜLLER, B.W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC) – a critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, 1984, v. 20, p. 217–233.

WATSON, G. D. **Pharmaceutical analysis**: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. 2. Ed. London: Churchill Livingstone, 2005.

XU, X.; DEMERS, R.; GU, H.; CHRISTOPHER, L. J.; SU, H.; COJOCARU, L.; BOULTON, D.W.; KIRBY, M.; STOUFFER, B.; HUMPHREYS, W. G.; ARNOLD, M. E. Liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of saxagliptin and its major pharmacologically active 5-monohydroxy metabolite in human plasma: Method validation and overcoming specific and non-specific binding at low concentrations. **J. Chromatogr. B.**, 2012, v. 889-890, p.77-86.