

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE
PARA DETERMINAÇÃO DE OMARIGLIPTINA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

AMANDA MOHR

Porto Alegre, 2023

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE
PARA DETERMINAÇÃO DE OMARIGLIPTINA E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Dissertação apresentada por Amanda Mohr
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27/09/2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Bruna Medeiros Neves

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim

Universidade Federal do Pampa

CIP - Catalogação na Publicação

Mohr, Amanda
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA INDICATIVA DE
ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE OMARIGLIPTINA E
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO /
Amanda Mohr. -- 2023.
92 f.
Orientador: Martin Steppe.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Omarigliptina. 2. Quality by Design. 3. CLUE. 4.
Citotoxicidade. 5. Produtos de degradação. I. Steppe,
Martin, orient. II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar). O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

À minha família e namorado pelo suporte incondicional e apoio durante toda minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. Dr. Martin Steppe pela dedicada orientação, disponibilidade e conhecimentos compartilhados. Muito obrigada pelo incentivo e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Nathalie Ribeiro Wingert pela colaboração e suporte.

Aos colegas, professores e funcionários do laboratório LCQFar pelo auxílio e companhia durante este período.

Aos laboratórios LATOX e LDG da UFRGS e grupo de pesquisa em Espectrometria de Massas da UFCSPA pela disposição de equipamentos e contribuição em experimentos.

À UFRGS, em especial ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de integrar um programa de excelência.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

RESUMO

A omarigliptina (OMG) é um novo antidiabético indicado para o tratamento de diabetes tipo 2 em adultos com administração oral de 25 mg uma vez por semana. Para assegurar sua segurança e eficácia terapêutica, metodologias analíticas confiáveis devem ser desenvolvidas e aplicadas em seu controle de qualidade, além do estudo de produtos de degradação. Nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) para análise de OMG em sua forma farmacêutica. Além disso, análise por espectrometria de massas e ensaios de toxicidade foram executados em amostras de OMG submetidas a degradação forçada para obtenção das massas dos produtos de degradação formados e avaliar seus potenciais efeitos citotóxicos. O desenvolvimento e otimização do método por CLUE foi realizado aplicando a abordagem do *Analytical Quality by Design*, onde os parâmetros críticos que afetavam o método foram identificados e seu impacto sobre os atributos críticos de qualidade foram avaliados através de planejamento experimental. A separação cromatográfica final foi realizada em coluna Waters Acquity UPLC® BEH C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 µm), com comprimento de onda em detecção de 230 nm, fase móvel composta por tampão acetato de amônio 10 mM pH 6,5 e metanol (68:32, v/v), vazão de 0,22 mL/min a 40°C. Amostras de OMG foram submetidas a degradação forçada e o método desenvolvido foi capaz de separar e detectar sete picos de produtos de degradação. O método por CLUE foi validado de acordo com as diretrizes oficiais, demonstrando ser seletivo, linear, preciso, exato e sensível, e pode ser empregado para a análise de rotina de OMG em forma farmacêutica. A análise por espectrometria de massas confirmou três massas de produtos de degradação previamente descritas e quatro novos produtos foram identificados. A toxicidade da OMG e seus produtos de degradação foi investigada pela primeira vez utilizando ensaios de citotoxicidade *in vitro* e a amostra sob condição de estresse oxidativo apresentou citotoxicidade significativa, reforçando a importância de estudos de segurança. Diante do exposto, os resultados encontrados neste trabalho contribuem para o monitoramento da qualidade e perfil de estabilidade da OMG.

Palavras-chave: omarigliptina; quality by design; CLUE; citotoxicidade; produtos de degradação.

ABSTRACT

Omarigliptin (OMG) is a novel antidiabetic indicated for the treatment of type 2 diabetes in adults with oral administration of 25 mg once a week. To ensure its safety and therapeutic efficacy, reliable analytical methodologies must be developed and applied in its quality control, as well as the study of degradation products. In this scenario, the aim of this work was to develop and validate a stability-indicating ultra-fast liquid chromatography (UFLC) method for the analyses of OMG in dosage form. In addition, mass spectrometry analysis and toxicity assays were performed on OMG samples subjected to forced degradation to obtain the masses of the degradation products formed and evaluate their potential cytotoxic effects. The development and optimization of the UFLC method was performed by applying the Analytical Quality by Design approach, where the critical parameters affecting the method were identified and their impact on critical quality attributes were evaluated through design of experiments. The final chromatographic separation was performed using a Waters Acquity UPLC® BEH C18 column (50 × 2.1 mm, 1.7 μm) with detection wavelength at 230 nm, mobile phase composed of 10 mM ammonium acetate buffer pH 6.5 and methanol (68:32, v/v), flow rate of 0.22 mL/min at 40°C. OMG samples were subjected to forced degradation and the developed method was able to separate and detect seven degradation products peaks. The developed UFLC method was validated according to official guidelines, demonstrating to be selective, linear, precise, accurate and sensitive, and can be employed for the routine analysis of OMG in dosage form. Mass spectrometry analysis confirmed three previously described degradation product masses and four new products were identified. The toxicity of OMG and its degradation products was first investigated using *in vitro* cytotoxicity assays and the sample under oxidative stress condition showed significant cytotoxicity, reinforcing the importance of safety studies. Given the above, the results found in this work contribute to the monitoring of the quality and stability profile of the OMG.

Keyword: omarigliptin; quality by design; UFLC; cytotoxicity; degradation products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tratamento farmacológico recomendado para pacientes com DM2.....	26
Figura 2 – Mecanismo de ação GLP-1.....	28
Figura 3 – Estrutura química OMG.....	29
Figura 4 – Perfil de degradação real e potencial.....	31

Capítulo 1

Figure 1 – Chemical structure of OMG.....	45
Figure 2 – AQbD Workflow.....	49
Figure 3 – Sweet spot plot obtained in screening design.....	53
Figure 4 – Contour plot of CQAs on optimization design.....	55
Figure 5 – MODR with working point.....	55
Figure 6 – Chromatograms obtained from analysis of OMG 20 µg/mL (1) in photolytic UV-C (2), oxidative (3), and alkaline (4) forced degradation.....	56

Capítulo 2

Figure 1 – Chromatograms obtained from forced degradation of OMG by hydrolysis alkaline NaOH 0.1 M 15 min (1), hydrolysis acidic HCl 0.5 M 24h (2), photolysis UV-C 45 min (3), thermal 50°C 48h (4) and oxidative H ₂ O ₂ 3% 5h (5) stress conditions and OMG reference standard 20 µg/mL (6).....	70
Figure 2 – ESI-QTOF spectrum of [M+H] ⁺ ions of OMG.....	71
Figure 3 – ESI-QTOF spectrum of [M+H] ⁺ ions of OMG DPs formed under alkaline (1), oxidative (2), and photolytic (3) stress conditions.....	72
Figure 4 – Structure proposition of OMG degradation products identified by MS analysis (ChemAxon).....	74
Figure 5 – Results of cell viability assay of OMG 500 µM and samples submitted at stress conditions (alkaline, photolysis and oxidation) by MTT reduction (1) and NR uptake (2) in 3T3 cells at 24 h incubation time. Control represent cells without treatment and solvent control was assessed with 1% DMSO solution (**p > 0.01; ***0.001; ANOVA/Bonferroni).....	75

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1 – CMPs levels in screening.....	52
Table 2 – CMPs and CQAs levels in optimization design.....	54
Table 3 – Results of precision and accuracy for OMG samples.....	57

Capítulo 2

Table 1 – MS settings.....	68
Table 2 – Summary of DPs found in MS analysis.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ALO – Alogliptina
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AQbD – *Analytical Quality by Design*
ATP – *Analytical Target Profile*
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE - Cromatografia líquida de ultra eficiência
CMPs – Parâmetros críticos do método
CQAs – Atributos críticos de qualidade
DM2 – Diabetes tipo 2
DoE – Planejamento experimental
DPP4 - Dipeptidil peptidase-4
EM - Espectrometria de massas
GLP-1 – Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
HbA1c - Hemoglobina glicada
ICH - Conselho internacional de harmonização
IFA - Insumo ativo farmacêutico
IV - Espectroscopia no infravermelho
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
m/z – Relação massa/carga
MODR – *Method Operable Design Region*
OMG – Omarigliptina
QbD - *Quality by Design*
r - Coeficiente de correlação
TRE – Trelagliptina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVO GERAL	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1. DIABETES MELLITUS	25
3.2. OMARIGLIPTINA	27
3.3. ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS.....	29
3.4. QUALITY BY DESIGN.....	32
3.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS OMG	39
3.7. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	41
4. CAPÍTULO 1: Analytical Quality by Design applied to the development of a stability-indicating ultra-fast liquid chromatography method for the determination of omarigliptin	43
5. CAPÍTULO 2: Analysis of omarigliptin forced degradation products by ultra-fast liquid chromatography, mass spectrometry and <i>in vitro</i> toxicity assay	63
6. DISCUSSÃO GERAL	79
7. CONCLUSÃO GERAL	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* é um grupo complexo de distúrbios metabólicos caracterizados pela presença de hiperglicemia na ausência de um tratamento. O tipo mais comum é o diabetes tipo 2 (DM2), responsável por cerca de 90-95% dos casos. Várias opções farmacológicas estão atualmente disponíveis para o tratamento da hiperglicemia do DM2. A omarigliptina (OMG) faz parte da classe dos inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) e foi aprovada no Japão, em 2015, para o tratamento de DM2 em adultos, quando o paciente não obtém o controle glicêmico adequado somente com dieta e exercício físico (IDF, 2021; MARIZEV®, 2020).

O monitoramento da qualidade dos medicamentos deve ser realizado desde o início da aquisição dos insumos farmacêuticos até o produto acabado, incluindo o pós-registro. Fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, além de fatores relacionados ao próprio produto, podem resultar em variações na qualidade do medicamento, como a formação de produtos de degradação, redução do teor do fármaco e diminuição da eficácia da terapia medicamentosa (ASBERG et al., 2016; BRASIL, 2015b; BRASIL, 2019; SILVA et al., 2009).

Por essa razão, métodos analíticos indicativos de estabilidade são aplicados no controle de qualidade para medir de forma confiável o insumo ativo farmacêutico sem interferência de seus produtos de degradação. A cromatografia líquida é uma técnica analítica amplamente utilizada para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Avanços nos sistemas cromatográficos possibilitaram o surgimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), que oferece várias vantagens como análises mais rápidas e redução no consumo de solventes e amostras, seguindo os princípios da química verde (ASHOK, 2012; MALDANER, 2009; TALEUZZAMAN, 2015).

Atualmente, o desenvolvimento de métodos analíticos é amplamente realizado pela abordagem de tentativa e erro, onde uma variável é alterada por vez até que um método adequado seja obtido. No entanto, este desenvolvimento fornece uma compreensão limitada da capacidade e robustez do método analítico, além de demandar alto tempo de testes e quantidades de solventes e amostras. Outra estratégia que vem crescendo é o *Quality by Design* (QbD), uma abordagem sistemática que pode ser aplicada ao desenvolvimento e otimização de métodos

analíticos, na qual são utilizados objetivos pré-definidos, permitindo uma compreensão racional do processo (ICH, 2009; ICH, 2022; SUMAN et al., 2016).

Além do desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, outros estudos podem ser realizados para adquirir mais informações acerca dos produtos de degradação formados. Destaca-se a espectrometria de massas, para obter as massas dos produtos de degradação formados e ensaios de toxicidade, que visam avaliar o potencial destes produtos em causar efeitos nocivos (BRASIL, 2015b; JAIN; BASNIWAL, 2013). GIORDANI e colaboradores (2019) já relataram que a presença de impurezas pode aumentar a citotoxicidade de alguns inibidores da DPP-4, ressaltando a importância de estabelecer a segurança dos produtos de degradação formados.

Até o presente momento, não há método analítico oficial descrito em farmacopeias ou compêndios oficiais para a determinação de OMG, impurezas e seus produtos de degradação. Na literatura existem poucos métodos relatados para determinação de OMG em forma farmacêutica e investigação dos seus produtos de degradação (EMANUELLI, SCHAPOVAL, 2020; KELANI et al., 2022; TANTAWY et al., 2021). Destes, nenhum utiliza a técnica de CLUE ou a abordagem do QbD para o desenvolvimento do método e, portanto, não se beneficia de suas vantagens. Também não foram encontrados estudos relatando a toxicidade dos produtos de degradação formados de OMG.

Neste contexto, justifica-se o desenvolvimento e validação de novo método analítico indicativo de estabilidade de OMG por CLUE, aplicando a abordagem do QbD, e estudo de identificação e avaliação de toxicidade de seus produtos de degradação. Desta forma, os novos estudos vêm a contribuir com o monitoramento das formulações farmacêuticas disponíveis para uso clínico e assegurar sua eficácia terapêutica e segurança.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar metodologia analítica indicativa de estabilidade por CLUE para a caracterização e determinação de OMG na forma farmacêutica comprimidos aplicando princípios do QbD.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver um método indicativo de estabilidade por CLUE para quantificação de OMG na sua forma farmacêutica;
- b) Aplicar os princípios do QbD para o desenvolvimento e otimização do método analítico;
- c) Validar o método proposto de acordo com guias oficiais e legislação vigente, avaliando os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez;
- d) Realizar estudo de degradação forçada e identificar o(s) produto(s) de degradação majoritário(s) através de espectrometria de massas;
- e) Realizar estudo de toxicidade *in vitro* da OMG e seu(s) produto(s) de degradação majoritário(s).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DIABETES MELLITUS

O *diabetes mellitus*, usualmente conhecido como diabetes, é um grupo complexo de distúrbios metabólicos, caracterizados pela presença de hiperglicemia na ausência de um tratamento. Sua ocorrência constitui uma das emergências de saúde global com crescimento mais rápido no século 21. Estima-se que haviam 537 milhões de pessoas com diabetes em 2021, com perspectiva de alcançar 643 milhões em 2030 e 783 milhões em 2045 (IDF, 2021).

Os sintomas característicos apresentados pelo diabetes são sede, poliúria, visão turva e perda de peso. No entanto, devido ao ritmo lento de agravamento da hiperglicemia, em alguns casos os sintomas podem ser leves ou ausentes, dificultando o diagnóstico. As complicações de longo prazo do diabetes são usualmente divididas em microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doenças cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica). Entretanto, se o controle adequado do diabetes for alcançado, as complicações graves podem ser adiadas ou evitadas por completo (WHO, 2019).

O DM2, responsável por cerca de 90-95% dos casos, é uma doença progressiva, na qual a secreção de insulina diminui ao longo do tempo, sendo causada pela combinação de resistência à insulina, em grande parte devido à obesidade, e secreção deficiente de insulina. A causa do defeito na secreção de insulina é provavelmente multifatorial, mas geralmente é considerada metabólica e não autoimune. Muitos fatores aumentam o risco de desenvolver DM2, incluindo idade, obesidade, estilos de vida não saudáveis e diabetes gestacional anterior. A frequência do DM2 também varia entre os diferentes subgrupos raciais e étnicos e apesar de ser mais comum em adultos, um número crescente de crianças e adolescentes também são afetados. O diagnóstico é baseado em valores de glicose plasmática ou hemoglobina glicada (HbA1c) (GENUTH et al., 2015; WHO, 2019).

O controle glicêmico é decisivo para a prevenção das complicações micro e macrovasculares no diabetes. Grandes ensaios clínicos randomizados (UKPDS, ADVANCE e DCCT) testaram a eficácia do controle glicêmico intensivo, tanto no diabetes tipo 1, como no DM2, e mostraram que a redução da HbA1c para abaixo de

7% promove diminuição dos desfechos microvasculares (SBD, 2020). Desta maneira, além do seu uso no diagnóstico, a HbA1c é comumente usada na prática clínica para monitorar o controle glicêmico, pois fornece uma medida da glicose plasmática média nas 8 a 12 semanas anteriores (WHO, 2020).

O tratamento não farmacológico é recomendado durante todas as fases do diabetes para melhorar o controle glicêmico. É aconselhado seguir um estilo de vida que inclua uma dieta saudável e equilibrada, evitar o uso de tabaco e álcool, atividade física regular e manutenção do peso corporal saudável. Atualmente, existe um grande número de opções farmacológicas para tratar a hiperglicemia do DM2, com eficácia demonstrada na redução da glicemia e com segurança cardiovascular estabelecida. Um esquema básico de tratamento farmacológico pode ser observado na Figura 1 (SBD, 2022).

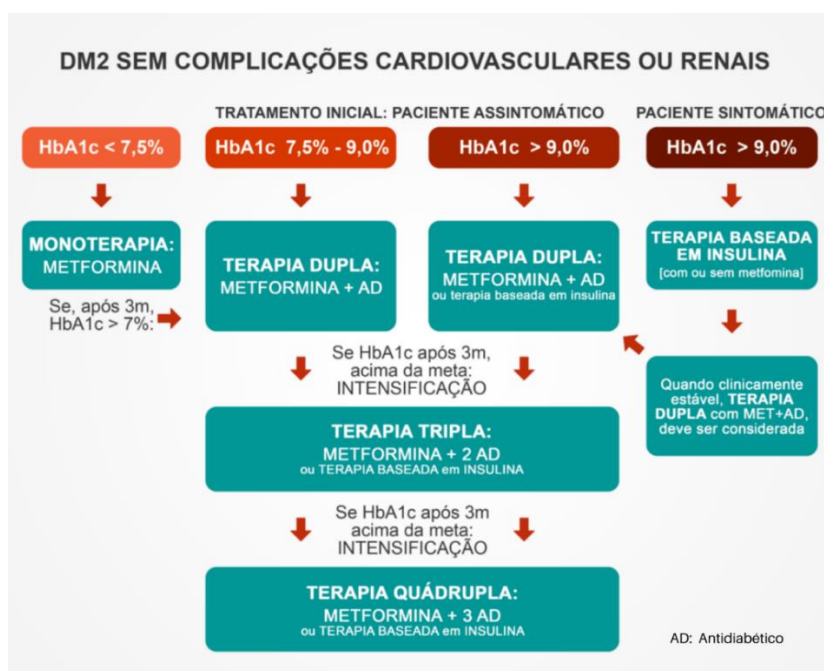


Figura 1 - Tratamento farmacológico recomendado para pacientes com DM2 (Adaptada de: SBD, 2020).

A metformina é o agente de primeira linha de escolha para o tratamento do DM2, dada sua eficácia e segurança, baixa incidência de hipoglicemia e baixo custo. Já para a terapia dupla, tripla ou quádrupla com metformina existem diversas classes de medicamentos orais e/ou injetáveis que podem ser combinadas, com diferentes mecanismos de ação, vantagens, efeitos adversos e contraindicações. As classes

são: agonistas do receptor do peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1); inibidores do cotransportador sódio-glicose; inibidores da DPP4; sulfonilureias, pioglitazona, inibidores da alfa-glicosidase e glinidas. A aplicação de insulina pode ser necessária quando os medicamentos orais não conseguirem atingir o controle glicêmico. É recomendado que a decisão do uso dos agentes antidiabéticos seja individualizada, considerando: eficácia; risco de hipoglicemia; proteção cardiovascular; proteção renal; efeito sobre o peso; tolerabilidade; custo; potenciais efeitos adversos e preferência do paciente (SBD, 2022).

3.2. OMARIGLIPTINA

Há cerca de 20 anos, a classe dos inibidores da DPP-4, também chamadas de gliptinas, foi introduzida como uma nova alternativa de tratamento para o DM2 com a finalidade de prolongar a atividade das incretinas. Desde então, a classe vem crescendo e já está presente nas diretrizes e guias nacionais e internacionais de tratamento de DM2 (HUSSAIN et al., 2019). Comparado com outros agentes antidiabéticos orais, os inibidores da DPP-4 induzem um efeito mais gradual na redução dos níveis de glicose e possuem um perfil de segurança favorável, podendo serem utilizados em pacientes idosos e na presença de insuficiência renal leve, sem necessidade de ajuste de dose. Esta classe exerce um efeito neutro sobre o peso corporal e, por estimularem a secreção de insulina de forma dependente da glicose, não causam hipoglicemia por si mesmas (SESTI et al. 2019). Atualmente, existem no Brasil 6 inibidores da DPP-4 aprovados, são eles: sitagliptina (2006), vildagliptina (2007); saxagliptina (2009); linagliptina (2011); alogliptina (2013); e evogliptina (2021) (ANVISA, 2022).

Em 2010, a Merck, denominada Merck Sharp & Dohme fora dos Estados Unidos e Canadá, iniciou os primeiros ensaios clínicos da OMG, um novo inibidor da DPP-4 com o diferencial de possuir administração oral uma vez por semana, o que pode favorecer a aderência ao tratamento. Em 2015, foi aprovada para uso pela Agência Japonesa de Produtos Farmacêuticos e Dispositivos Médicos para o tratamento de DM2 em adultos, com nome comercial Marizev®. Embora disponível para uso clínico no Japão, a empresa decidiu mais tarde, por razões comerciais, não submeter o processo para aprovação em outros locais (BURNES, 2015).

A OMG é uma potente gliptina que inibe com alta seletividade a enzima DPP-4. A DPP-4 é a enzima responsável pela rápida degradação de hormônios incretinas endógenos, como o polipeptídeo insulínico dependente de glicose e o GLP-1. Ambas as incretinas são liberadas do trato gastrointestinal em resposta à ingestão de nutrientes e estimulam a secreção de insulina pelas células B pancreáticas. Entretanto, até o momento, acredita-se que o principal agente do efeito terapêutico dos inibidores da DPP4 seja o GLP-1. Este também origina outros eventos importantes como a supressão da secreção de glucagon, o armazenamento de glicogênio e retardo no esvaziamento gástrico. Portanto, a inibição da DPP-4 aumenta os níveis de GLP-1, promove a secreção de insulina e reduz os níveis de glicose no plasma, contribuindo no tratamento da DM2 (Figura 2) (DEACON, 2020; MULVIHILL; DRUCKER, 2014; THORNBERRY; GALLWITZ, 2009).

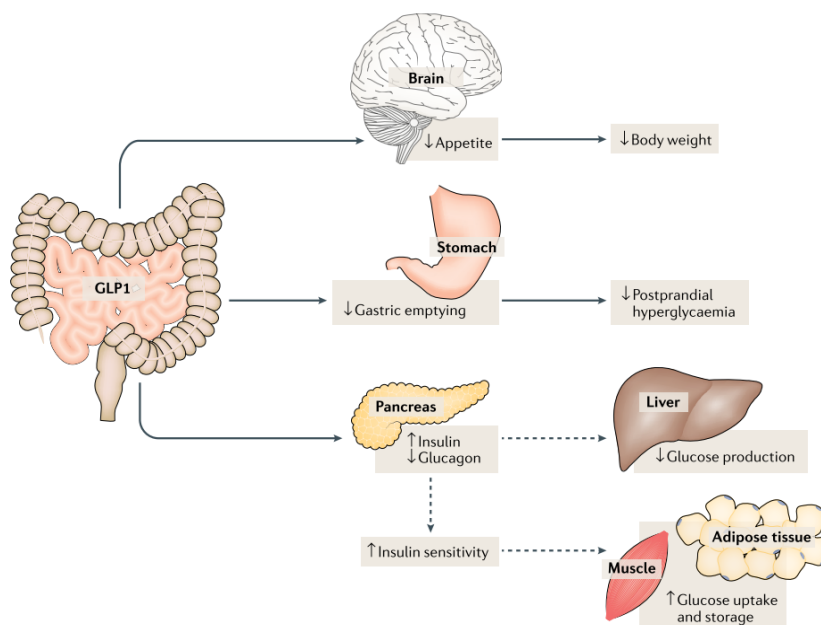


Figura 2- Mecanismo de ação GLP-1 (DEACON, 2020).

A OMG é indicada para tratamento da DM2 em adultos quando o paciente não consegue obter o controle glicêmico adequado somente com a dieta e exercício físico. Possui apresentação farmacêutica de 12,5 e 25 mg em comprimido revestido branco em forma de amêndoa. Sua dose recomendada é de 25 mg por via oral uma vez por semana, ou 12,5 mg por via oral uma vez por semana em pacientes com disfunção

renal grave, insuficiência renal terminal ou que requerem hemodiálise ou diálise peritoneal (MARIZEV[®], 2020).

É rapidamente absorvida após administração oral, atingindo sua concentração plasmática máxima de 750 nmol/L, em aproximadamente, 1 hora após a ingestão e atingindo o estado estacionário na segunda semana de administração. É excretada principalmente pelos rins como fármaco inalterado, sendo que a filtração glomerular e a reabsorção estão envolvidas na excreção. Suas principais reações adversas são hipoglicemia, penfigóide, pancreatite aguda e obstrução intestinal. É contraindicada para pacientes com hipersensibilidade aos componentes do medicamento, pacientes com cetose grave, coma diabético ou pré-coma, diabetes tipo 1, pacientes com infecções graves que requerem controle glicêmico com insulina e pacientes com trauma grave antes e após cirurgia (BURNES, 2015; MARIZEV[®], 2020).

Possui nome químico (2R,3S,5R)-2-(2,5-difluorofenil)-5-[2-(metilsulfonyl)-2,6-di-hidropirrol[3,4-c]-pirazol-5(4H)-il]-tetra-hidro-2H-pirano-3-amina, registro CAS 1226781-44-7, fórmula química C₁₇H₂₀F₂N₄O₃S, massa molecular de 398,43 g/mol, absorção máxima aproximada de 230 nm e valores de pKa 3,5 e 7,1 (Figura 3). É solúvel em etanol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida e pouco solúvel em acetonitrila, metanol, acetato de isopropila e água (BIFTU et al., 2014; MARIZEV[®], 2020).

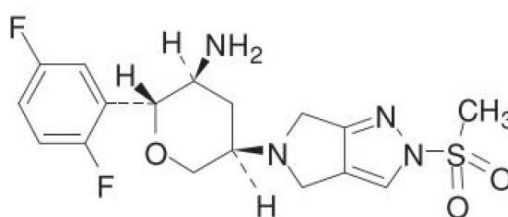


Figura 3 - Estrutura química OMG (MARIZEV[®], 2020).

3.3. ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

Os produtos farmacêuticos podem sofrer influência de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, de fatores relacionados ao próprio produto como as propriedades físicas e químicas do insumo ativo farmacêutico (IFA) e excipientes farmacêuticos, além de fatores como forma farmacêutica, processo de fabricação, tipo

e propriedades dos materiais de embalagem. Estas influências podem resultar em variações na qualidade do IFA e do medicamento em função do tempo, como a formação de produtos de degradação, redução do teor do fármaco, alteração no perfil de liberação e diminuição da eficácia da terapia medicamentosa. À vista disso, os estudos de estabilidade são um conjunto de testes projetados para obter informações sobre a variação da qualidade de um IFA ou medicamento diante da influência dos fatores citados anteriormente (BRASIL, 2015b; BRASIL, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) classifica os estudos de estabilidade em: acelerado; de acompanhamento; de longa duração; em uso; reduzido e de fotoestabilidade. O estudo de estabilidade acelerado avalia possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou medicamento, em condições forçadas de armazenamento, visando auxiliar na determinação dos seus prazos de validade e avaliar o efeito de curtas excursões fora dos cuidados de conservação preconizados. Já o estudo de estabilidade de longa duração verifica as características físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou medicamento nas condições de armazenamento e prazo de validade propostos (BRASIL, 2019).

Produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento. Apesar de serem encontrados durante os estudos de estabilidade de longa duração e/ou acelerado, estes estudos não são utilizados para a finalidade de determiná-los, pois, em geral, a degradação que ocorre é pequena, não fornecendo resultados confiáveis. Para prover uma degradação em maior escala é necessário expor o IFA ou medicamento em condições mais extremas do que as praticadas no estudo de estabilidade de longa duração, ou seja, realizar o estudo de degradação forçada (BRASIL, 2015b).

Segundo a RDC nº 53/2015 da ANVISA, os estudos de degradação forçada permitem a geração de produtos de degradação por meio da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação, entre outras. Este estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornece informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2015).

Destaca-se que geralmente aparecem mais produtos de degradação no estudo de degradação forçada do que no estudo de estabilidade. Portanto, o perfil do estudo

de degradação forçada é maior que o perfil de degradação “real”, podendo ser chamado de perfil de degradação “potencial”. O perfil de degradação “potencial” pode ser diferente do “real” qualitativamente e/ou quantitativamente, mas do ponto de vista qualitativo o perfil “real” está contido no perfil “potencial”, conforme observado na Figura 4 (BRASIL, 2015b).

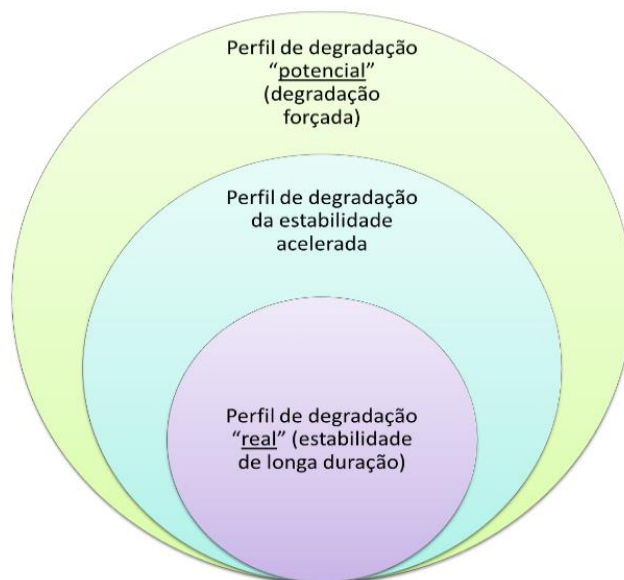


Figura 4 – Perfil de degradação real e potencial (BRASIL, 2015b).

A escolha das condições de estresse utilizadas nos estudos de degradação forçada, como reagentes, concentração, tempo de exposição, temperatura, entre outros, irá depender das características do produto. Abaixo seguem recomendações gerais de escolha.

Para os estudos de hidrólise de degradação forçada, sugere-se utilizar como reagente ácido clorídrico ou ácido sulfúrico 0,1-1 M para a hidrólise ácida, e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio 0,1-1 M para a hidrólise básica. O teste é normalmente iniciado em temperatura ambiente e, se não houver degradação, pode-se aumentar a temperatura para 50-70 °C. Após o teste, a amostra deve ser neutralizada usando ácido, base ou tampão adequados, evitando mais decomposição (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2014; BRASIL, 2015b; SINGH et al., 2018).

O peróxido de hidrogênio à 0,1-3% é amplamente usado para a oxidação em estudos de degradação forçada, mas outros agentes oxidantes, como íons metálicos, oxigênio e iniciadores de radicais também podem ser usados. Além disso, a amostra

também pode ser aquecida para acelerar a degradação (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2014; BRASIL, 2015b; SINGH et al., 2018).

Os estudos de degradação térmica podem ser por calor seco (aquecimento) e/ou calor úmido (umidade). Amostras em estado sólido devem ser expostas ao calor seco e úmido, enquanto os líquidos e semissólidos de base aquosa devem ser expostos somente ao calor seco. Os testes são conduzidos normalmente à 40-80 °C e o efeito da temperatura na degradação térmica de uma substância pode ser estudado através da equação de Arrhenius (BLESSY et al., 2014; BRASIL, 2015b).

Para a fotólise, as exposições recomendadas são: iluminação geral não inferior a 1,2 milhões de lux horas; energia ultravioleta próxima integrada não inferior a 200 W-h/m²; e comprimento de onda de luz na faixa de 300-800 nm. Para amostras em solução, recomenda-se utilizar acetonitrila como co-solvente de escolha, pois o metanol pode produzir mais artefatos a partir de radicais metoxi (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2014; BRASIL, 2015b; SINGH et al., 2018).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos é a principal técnica recomendada e utilizada para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Outros detectores e técnicas podem auxiliar na elucidação das estruturas químicas dos produtos de degradação estudados, destacando-se espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear e espectroscopia no infravermelho (IV) (BRASIL, 2015b; JAIN; BASNIWAL, 2013).

Ao longo dos anos, devido à necessidade de análises mais rápidas e eficientes, foi desenvolvido a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), um sistema adaptado que utiliza colunas cromatográficas com tamanho de partículas de empacotamento menores do que as da CLAE (3,5 - 5 µm). De maneira geral, as vantagens da CLUE sobre a CLAE são a análise mais rápida sem o comprometimento do desempenho cromatográfico e menor consumo de solvente, reagente e amostra, contribuindo para a redução de resíduos gerados (ASHOK, 2012; MALDANER, 2009; TALEUZZAMAN, 2015).

3.4. QUALITY BY DESIGN

Atualmente, o desenvolvimento de métodos cromatográficos é amplamente realizado pela abordagem de tentativa e erro, onde uma variável é alterada de cada

vez até que um método adequado seja obtido. No entanto, este desenvolvimento fornece uma compreensão limitada da capacidade e robustez do método analítico. Outra estratégia que vem crescendo desde a sua introdução no guia do Conselho Internacional de Harmonização (ICH) Q8, é o QbD, uma abordagem sistemática para o desenvolvimento farmacêutico que utiliza objetivos predefinidos e permite uma compreensão completa dos fatores críticos envolvidos. Quando aplicado ao desenvolvimento e otimização de métodos analíticos, alguns autores se referem ao QbD como *Analytical Quality by Design* (AQbD) (ICH, 2009; ICH, 2022; SUMAN et al., 2016).

O AQbD se inicia com a definição do *Analytical Target Profile* (ATP), ou seja, um detalhamento do objetivo do método analítico com seus requisitos de qualidade. De maneira geral, o ATP pode ser estabelecido através da identificação do alvo que será medido (como IFA ou medicamento), da condição da amostra (como forma farmacêutica), da finalidade da medição (como estudo de estabilidade) e dos critérios de qualidade exigidos (como exatidão e precisão). Baseado nas necessidades e intenções do ATP, a técnica analítica adequada é selecionada e realizado o *Scouting*, onde o conhecimento prévio é reunido e experimentos preliminares são realizados (BHUTANI et al., 2014; FUKUDA et al., 2018).

Em seguida, são definidos os atributos críticos de qualidade (CQAs), atributos considerados críticos na técnica analítica escolhida. Também podem ser chamados de fatores dependentes ou respostas, e serão diretamente correlacionados a uma representação matemática da qualidade do desempenho do método. Seus valores devem permanecer dentro de limites e/ou intervalos adequados para garantir a qualidade desejada. Exemplos de CQAs na cromatografia líquida incluem tempo de retenção, tempo total de análise, área, fator de cauda, fator de capacidade, pressão do sistema, resolução do pico, número de pratos, entre outros (DEIDDA et al., 2018).

A avaliação de risco é um processo sistemático de organização de informações que permite discriminar as fontes de variação/riscos de um sistema para apoiar a tomada de decisão. Durante esta etapa, os parâmetros críticos do método (CMPs) são investigados e identificados. Eles são os parâmetros críticos que influenciam um ou mais CQAs estabelecidos anteriormente e, conseqüentemente, afetam o desempenho do método analítico. Os CMPs também podem ser chamados de fatores independentes ou variáveis. Alguns exemplos são taxa de vazão, temperatura do forno da coluna,

composição da fase móvel, pH do tampão, tipo ou natureza de fase estacionária, entre outros. A investigação dos CMPs é fundamental para fornecer uma compreensão baseada na ciência e avaliar o risco. Entre as ferramentas utilizadas na avaliação de risco, destaca-se o diagrama de Ishikawa (espinha de peixe), amplamente utilizado pois permite identificar e classificar as principais fontes de risco de forma simples e eficaz (DEIDDA et al., 2018; FUKUDA et al., 2018).

A próxima etapa é desenvolver o método analítico compreendendo e avaliando os impactos dos CMPs sobre os CQAs, onde planejamento experimental (DoE) é amplamente aplicado. O DoE é uma ferramenta estruturada e econômica utilizada para determinar as relações entre fatores independentes que afetam um ou mais fatores dependentes através do estabelecimento de modelos matemáticos. Com base no objetivo dos experimentos, o DoE pode ser utilizado em etapas de triagem ou otimização do método (BHUTANI et al., 2014; FUKUDA et al., 2018; PARK et al., 2022).

A etapa de triagem pode ser empregada para investigar todos os CMPs estabelecidos na avaliação de risco. Esta triagem permite identificar os fatores independentes que não são influentes e fixar seus valores, reduzindo o número de CMPs a serem estudados posteriormente na fase de otimização. CMPs qualitativos, como por exemplo fase estacionária e fase móvel em cromatografia, são geralmente estudados nesta etapa. Além disso, é possível estreitar e/ou mover a faixa de valores dos fatores independentes que se mostrarem relevantes de acordo com os resultados observados. DoE de dois níveis como *Full Factorial*, *Fractional Factorial* e *Plackett-Burman* são frequentemente utilizados na triagem, pois permitem estudar um grande número de fatores independentes com um número reduzido de experimentos (DEIDDA et al., 2018; FUKUDA et al., 2018; SAHU et al., 2018).

A fase de otimização investiga os CMPs selecionados com base nos resultados da triagem ou diretamente da avaliação de risco. Uma das limitações dos delineamentos de triagem é permitir apenas modelar a superfície de resposta de 1ª ordem (linear), pois usualmente possuem apenas dois níveis para cada CMP. Em etapas de otimização, geralmente são aplicados delineamentos de 3 a 5 níveis para cada CMP, o que permite modelar a superfície de resposta de 2ª ordem (quadrática). Desta maneira, se obtém um modelo de regressão preditivo, e além de gráficos bidimensionais (*contour plots*), também é possível estabelecer gráficos

tridimensionais (superfícies de resposta) para interpretar os resultados. DoE simétricos como *Full Factorial* de três níveis, *Central Composite*, *Box-Behnken*, *Taguchi* e *Doehlert* são usualmente utilizados nesta etapa. Quando o número de CMPs a serem estudados é alto, o DoE assimétrico *D-optimal* pode ser empregado para reduzir o número de experimentos usando o critério matemático de *D-optimality*. Em todos os DoEs, repetições no ponto central e/ou em cada experimento devem ser realizadas para obter uma estimativa da variância experimental, necessária para estimar a validade do modelo por análise de variância (ANOVA) (DEIDDA et al., 2018; FUKUDA et al., 2018).

A partir dos resultados do DoE de otimização, obtém-se o *Method Operable Design Region* (MODR), também chamado de *Design Space*. O MODR pode ser considerado como uma região ou zona de robustez onde a qualidade do desempenho do método é garantida em cada ponto com um nível de probabilidade especificado. O MODR é estabelecido com base nas interações entre CMPs e CQAs, onde quanto maior o MODR, mais robusto é o método em relação ao cumprimento dos requisitos dos CQAs. Mover os valores dos CMPs dentro do MODR não é considerado uma modificação de método analítico sujeita a notificação, o que garante flexibilidade regulatória. Sendo assim, o ponto de trabalho (dentro do MODR) pode ser escolhido pelo analista com base em tempo de análise, custo, quantidade de solvente, critérios estatísticos de maior probabilidade de cumprir os requisitos, entre outros (BHUTANI et al., 2014; DEIDDA et al., 2018; ICH, 2022; PARK et al., 2022).

Por fim, o método analítico deve ser validado seguindo os parâmetros normativos de validação e realizado o controle do método, onde são definidas estratégias de controle adequadas para garantir o desempenho e a qualidade do procedimento analítico. O controle do método é estabelecido baseado nos dados coletados durante a avaliação de risco, DoE e validação do método, e pode incluir parâmetros específicos a serem controlados e/ou testes de adequabilidade do sistema (PARK et al., 2022).

Diversos estudos relatados na literatura constataam o alto grau de aplicabilidade e vantagens da abordagem AQbD no desenvolvimento de métodos analíticos (BANDOPADHYAY et al., 2020; GKOUNTANAS et al., 2022; GURRALA et al., 2022; NAYAK et al., 2021; STAJIĆ et al., 2021). Além disso, o AQbD pode ser um diferencial no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade e estudos de produtos de

degradação e/ou impurezas, onde a resolução entre os picos pode ser frequentemente um parâmetro crítico (ELLWANGER et al., 2020; HUBERT et al., 2014; OLEGÁRIO et al., 2023; SUMAN et al., 2016; PASQUINI et al., 2020; PERAMAN et al., 2015; WINGERT et al., 2018). Abaixo, são detalhados três destes trabalhos.

Wingert et al. (2018) aplicaram a abordagem AQbD para otimizar um método indicativo de estabilidade para determinação de ticagrelor e seus produtos de degradação na presença de impurezas de síntese. Os CMPs (percentual de solvente orgânico, temperatura do forno, fluxo e pH e concentração do tampão) foram otimizados utilizando os DoEs *Fractional Factorial Resolution V* e *Central Composite Face* com base nas respostas e interações obtidas para os CQAs (resolução, tempo de análise, fator de retenção e a pressão máxima do sistema).

Pasquini e colaboradores (2020) desenvolveram um método por LC-EM para a determinação de nintedanibe e suas impurezas aplicando os princípios do AQbD. O ATP do método foi definido como a determinação simultânea precisa do composto principal nintedanibe e suas sete potenciais impurezas em um curto tempo de análise, e foi baseado na obtenção de uma seletividade adequada entre o IFA e os picos de impurezas adjacentes. DoEs foram aplicados para investigar a influência dos CMPs (fluxo, temperatura do forno, percentual de ácido fórmico, tipo de solvente orgânico, gradiente do solvente orgânico) sobre os CQAs (tempo de análise, tempo de retenção e resolução).

Olegário et al. (2023) desenvolveram e validaram um método analítico capaz de separar e quantificar a S-Rivaroxabana (S-RIV), que apresenta atividade farmacológica, e sua impureza enantiomérica R-Rivaroxabana (R-RIV). Com a aplicação do QbD, os autores conseguiram identificar e avaliar os parâmetros mais críticos para o método e assim definir as condições ideais. Os CQAs foram definidos como resolução, tempo de análise, simetria e número de pratos.

3.5. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Após o desenvolvimento de novos métodos analíticos como, por exemplo, os métodos indicativos de estabilidade, a validação é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, assegurando que o método é

adequado para a finalidade pretendida (SHABIR, 2003). Procedimentos para validação de métodos analíticos encontram-se disponíveis em guias oficiais e legislação vigente que descrevem os principais parâmetros a serem avaliados durante a validação, entre eles: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação; e robustez (BRASIL, 2017; ICH, 2005; FDA, 2015).

A seletividade do método analítico é a capacidade de avaliar, inequivocamente, o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes, excipientes e componentes da matriz. Uma maneira de se avaliar a seletividade é através da comprovação da pureza cromatográfica do sinal do analito (BRASIL, 2017).

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para determinação da linearidade, deve-se realizar uma curva analítica com no mínimo 5 pontos, ou seja, 5 concentrações diferentes, preparadas de maneira independente. Além da representação gráfica da curva analítica, é necessário avaliar alguns dados, como: gráfico de dispersão dos resíduos; equação da reta de regressão de y em x ; associação linear entre as variáveis por meio do coeficiente de correlação (r) e de determinação; e avaliação da significância do coeficiente angular. O coeficiente r permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A partir dos estudos de linearidade, a faixa de trabalho é estabelecida conforme a aplicação pretendida (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Deve ser expressa pelo desvio padrão relativo e é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade; precisão intermediária; e reprodutibilidade. A repetibilidade avalia as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação em uma única corrida analítica. Deve-se utilizar no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear do método analítico (3 níveis com 3 repetições cada) ou a partir de no mínimo 6 repetições a 100% da concentração do teste. A precisão intermediária expressa a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias

diferentes, e realizada por operadores distintos. Deve contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade. Já a reprodutibilidade deve ser obtida por meio da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes. É aplicável em estudos de colaboração entre laboratórios e na padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado método e um valor de referência aceito como verdadeiro. As amostras para avaliação da exatidão devem ser preparadas de maneira independente e deve-se utilizar no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear do método analítico (3 níveis com 3 repetições cada). A escolha da abordagem para determinação da exatidão é realizada de acordo com o método analítico em estudo, como por exemplo: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; e adição padrão (BRASIL, 2017).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD pode ser determinado de três maneiras diferentes: método visual; método razão sinal-ruído (razão maior ou igual a 2:1); ou método baseado em parâmetros da curva analítica. O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida sob as condições experimentais estabelecidas. Os mesmos métodos de LD podem ser adotados para o LQ, porém a razão deve ser maior ou igual a 10:1 para o método razão sinal-ruído (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

A robustez indica a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico na fase móvel, pH da fase móvel, temperatura da coluna, etc. As mudanças introduzidas refletem possíveis alterações que podem acontecer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (BRASIL, 2017).

Além dos itens mencionados acima, a adequabilidade do sistema deve ser monitorada durante as análises. A adequabilidade do sistema ou "*system suitability*" é

um conjunto de testes, definidos durante o desenvolvimento e validação do método, que demonstra que o sistema utilizado para a análise está apto para o uso pretendido e que é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Os principais parâmetros avaliados são: fator de retenção (k'), resolução, fator de cauda e número de pratos (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

3.6. MÉTODOS ANALÍTICOS OMG

Alguns grupos de pesquisa, desenvolveram diferentes métodos para quantificação de OMG e investigaram seus produtos de degradação. Entretanto, atualmente, não existe nenhum método analítico oficial descrito em farmacopeias ou compêndios oficiais para determinação de OMG, suas impurezas e seus produtos de degradação.

Wang et al. (2021) desenvolveram um método por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de OMG e pioglitazona em plasma de ratos. Utilizaram uma coluna Exsil Mono C18 (2,0 × 50 mm, 3 μ m) mantida a 30 °C e solução aquosa de ácido fórmico 0,02% (A) e metanol:acetonitrila 1:1 (B) como fase móvel, com eluição gradiente com taxa de vazão de 0,3 mL/min. Usou-se modo de ionização positiva com fonte de íons de *electrospray*, e, após validado, o método foi aplicado ao estudo farmacocinético da pioglitazona combinada com OMG em ratos. Outros métodos CL-EM/EM também foram aplicados para a quantificação de OMG em plasma e/ou urina em estudos de farmacocinética e farmacodinâmica de OMG (ADDY et al., 2016; BIFTU et al., 2014; LI et al., 2017).

Ayoub et al. (2018) desenvolveram um método espectrofluorimétrico aprimorado de micela para determinação de OMG em forma farmacêutica, baseado em seu comportamento de fluorescência nativa. O DoE de *Plackett-Burman* foi utilizado para investigar as condições ideais do método e testes de uniformidade de conteúdo e liberação *in vitro* também foram realizados. Os autores também aprimoraram uma técnica de extração de OMG em plasma humano e investigaram o reposicionamento da OMG como agente neuroprotetor (AYOUB et al., 2021; MOWAKA et al., 2020).

Além disso, o grupo de pesquisa desenvolveu um método por cromatografia líquida para análise simultânea de OMG, trelagliptina (TRE) e alogliptina (ALO) em

plasma. O método proposto foi aplicado com sucesso para análise simultânea de TRE e ALO, contudo, teve interferência para a OMG. Diante disso, o grupo aplicou separadamente o mesmo método em amostras de IFA OMG e realizou um estudo comparativo de três diferentes fases estacionárias. A cinética de degradação em meio ácido também foi estudada utilizando HCl 2 M em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20 e 25 min) e em diferentes temperaturas (60, 70 e 80 °C). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna Hypersil Gold C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.9 µm), fase móvel acetonitrila:tampão fosfato (50:50) pH 3.5, eluição isocrática e detecção à 240 nm para OMG e à 274 nm para TRE e ALO (ATTALLAH et al., 2019).

Emanuelli e Schapoval (2020) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade por CLAE para avaliar a cinética de degradação oxidativa e fotolítica da OMG e identificar os principais produtos de degradação oxidativa. As separações foram realizadas usando uma coluna Agilent ZORBAX C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm), fase móvel composta de tampão fosfato pH 7.0:metanol (45:55), vazão de 0.8 mL/min e detecção a 230 nm. Foram identificados por LC-EM dois produtos de degradação oxidativa (peróxido de hidrogênio 10% por 24 h) com m/z 321 e 337 e suas rotas de degradação foram propostas.

Tantawy et al. (2021) desenvolveram e validaram um método por cromatografia em camada delgada e um método por CLAE para avaliação de OMG em IFA e comprimidos. No método por cromatografia em camada delgada, placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel foram utilizadas como fase estacionária juntamente com metanol:acetato de etila:amônia 33% (2:8:1) como fase móvel. Já na CLAE foi utilizado uma coluna Hypersil ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) e fase móvel composta por tampão fosfato pH 3,5:acetonitrila (80:20) com eluição isocrática e vazão de 1,0 mL/min. Ambos os métodos foram aplicados para estudar o perfil de estabilidade da OMG quando submetida à degradação forçada e os produtos de degradação hidrolítica e oxidativa foram identificados, m/z 321 e 415, respectivamente, utilizando IV e espectrometria de massas.

Recentemente Kelani e colaboradores (2022) desenvolveram e validaram seis técnicas espectrofotométricas seletivas, quatro univariadas e duas multivariadas, para a determinação de OMG juntamente com os dois produtos de degradação previamente investigados por Tantawy et al. (2021). Os métodos espectrofotométricos univariados propostos foram subtração de razão, primeira

derivada, razão derivada e diferença de razão e os métodos multivariados propostos foram mínimos quadrados parciais e redes neurais artificiais.

3.7. Ensaio toxicológicos

Além da identificação de possíveis produtos de degradações formados em medicamentos, é relevante estudar e estabelecer a segurança destes produtos. Ensaio de toxicidade são utilizados para avaliar o potencial de uma substância em causar efeitos nocivos e podem ser empregados em amostras de produtos farmacêuticos, contendo seus produtos de degradação. Inicialmente, ensaios de viabilidade celular podem ser executados para avaliar o potencial dos produtos de degradação em causar dano celular. Em sequência, ensaios mais específicos sobre os mecanismos de toxicidade podem ser estudados, como: potencial de membrana mitocondrial; produção de espécies oxidativas; e genotoxicidade (teste de ames, micronúcleo e cometa) (GIORDANI et al., 2019; WINGERT et al., 2019).

Existem diversos ensaios de viabilidade celular que podem ser usados para estimar o número de células viáveis, como: redução de tetrazólio; redução de resazurina; incorporação de vermelho neutro; marcadores de protease; e detecção de adenosina trifosfato. De maneira geral, os ensaios de viabilidade celular se baseiam no uso de um reagente que é convertido pelas células viáveis em um subproduto colorido ou fluorescente, que é medido com um leitor de placas. O sinal medido (absorbância ou fluorescência) será proporcional ao número de células viáveis presentes, pois as células que morreram, devido a alguma toxicidade, perderam a capacidade de converter o reagente (RISS et al., 2016). Até o momento, não existem estudos relatados na literatura sobre a toxicidade de produtos de degradação de OMG.

4. CAPÍTULO 1

Desenvolver e aplicar métodos analíticos indicativos de estabilidade para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos é indispensável para assegurar segurança e eficácia ao paciente. O desenvolvimento de métodos por tentativa e erro é amplamente utilizado, porém, fornece uma compreensão limitada sobre a sua capacidade e robustez. Outra abordagem recomendada por órgãos reguladores e que vem sendo cada vez mais utilizada é o *Analytical Quality by Design*. Além disso, de modo a atender as demandas de rotinas analíticas, é desejável que o método aplicado seja rápido mas sem comprometimento de eficiência, sendo a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência adequada para esta finalidade. Devido ao seu baixo consumo de solventes, reagentes e amostras, a técnica também contribui para um menor impacto ambiental de geração de resíduos. Em vista disso, este capítulo consta sobre a abordagem *Analytical Quality by Design* aplicada ao desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de ultra eficiência para determinação de omarigliptina.

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 44 – 61, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

5. CAPÍTULO 2

A investigação acerca de produtos de degradação de medicamentos é necessária para assegurar a sua qualidade e segurança. Estudos de degradação forçada utilizando diferentes condições de estresse são usualmente empregados, pois permitem a geração de potenciais produtos de degradação em um curto período de tempo. Diferentes técnicas analíticas podem ser aplicadas para identificação dos produtos de degradação formados, elucidação de estruturas químicas, determinação de rotas de degradação, estabelecimento de cinética de degradação e avaliação de toxicidade. Tendo em vista a necessidade de estudos mais detalhados sobre os produtos de degradação da omarigliptina, técnicas de cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas, assim como estudos de toxicidade *in vitro* foram aplicadas neste trabalho. Dessa forma, o presente capítulo aborda a investigação de produtos de degradação da omarigliptina, com foco na sua identificação e estabelecimento de toxicidade.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 64 – 77, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.

6. DISCUSSÃO GERAL

O controle de qualidade de medicamentos é necessário para garantir e assegurar a sua eficácia e segurança ao paciente. Segundo a ANVISA (2019b), métodos indicativos de qualidade devem ser utilizados no controle de qualidade farmacêutico, pois são capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades do medicamento, além de mensurarem com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência. Para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, estudos de degradação forçada são empregados, pois permitem a rápida geração de potenciais produtos de degradação formados.

A OMG foi recentemente aprovada para uso e apresenta poucos trabalhos relatados sobre metodologias analíticas para sua quantificação e estudos de seus produtos de degradação. Visando desenvolver um novo método indicativo de estabilidade rápido, robusto e compatível com a espectrometria de massas, a técnica de CLUE foi escolhida. Além de proporcionar análises mais rápidas sem o comprometimento do desempenho cromatográfico, a CLUE utiliza taxas de vazão de fase móvel menores em comparação a CLAE, resultando na redução do consumo de solventes e reagentes, e conseqüente menor impacto ambiental. À vista disto, este trabalho focou no desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade por CLUE para quantificação de OMG na sua forma farmacêutica.

Inicialmente, foram estabelecidas as condições de degradação forçada de OMG por hidrólise ácida e básica, oxidação, térmica e fotólise. Com base no trabalho de Emanuelli e Schapoval (2020), diferentes molaridades ácidas e alcalinas, porcentagem de peróxido de hidrogênio, temperatura e tempos de exposição foram testadas, visando atingir uma redução na área do pico da OMG de pelo menos 10%. De modo a evitar a geração de produtos de degradação secundários, algumas condições mais brandas do que as descritas no trabalho foram utilizadas, como: hidrólise em NaOH 0.1 M por 15 min ao invés de NaOH 0.5 M por 30 min, substituição de peróxido de hidrogênio 10% por 24h para 3% por 5h e exposição a radiação UV-C durante 45 min ao invés de 1 hora. Com as condições definidas, amostras de OMG foram rotineiramente submetidas a degradação forçada e utilizadas durante todo o desenvolvimento do método analítico por CLUE, para comprovar a capacidade do

método em indicar estabilidade (ALSANTE et al., 2007; BRASIL, 2015b, EMANUELLI, SCHAPOVAL, 2020).

Seguindo recomendações do Guia ICH Q14 (2022), o método indicativo de estabilidade foi desenvolvido e otimizado aplicando os princípios do AQbD, para um entendimento racional das etapas (Capítulo 1). Na fase do *Scouting*, o conhecimento prévio foi reunido e experimentos preliminares foram realizados. O ponto de partida foi o método desenvolvido e validado por CLAE para quantificação de OMG proposto por Emanuelli e Schapoval (2020). Testes foram realizados para adaptá-lo à técnica de CLUE e torná-lo compatível com o acoplamento com a espectrometria de massas. Dessa forma, a coluna analítica Agilent Zorbax C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm) foi substituída por uma coluna adequada à técnica de CLUE. A fase móvel composta de tampão fosfato de potássio pH 7,0:metanol (45:55), anteriormente utilizada, precisou ser alterada para tampão acetato de amônio por não ser compatível com a EM. Outras condições experimentais como natureza do solvente orgânico, pH da fase móvel próximo a 7,0 e detecção com comprimento de onda a 230 nm foram mantidos, pois apresentaram os melhores resultados cromatográficos.

Durante a avaliação de risco, foi observado que os CMPs que necessitavam de mais investigação eram: porcentagem de solvente orgânico na fase móvel; taxa de vazão; e temperatura da coluna. Para avaliá-los, foi aplicado um delineamento linear de triagem *Plackett Burman* em dois níveis, com um total de 11 experimentos incluindo três pontos centrais ($\alpha = 0,05$). Com o DoE, foi possível observar que o aumento da porcentagem de metanol na fase móvel diminuiu o tempo de análise. A utilização de proporções de 30 e 40% de metanol apresentaram tempo de análise menores que 10 min, enquanto que a proporção 20% de metanol resultou em análises longas, com tempos maiores que 15 min. As temperaturas de 40°C e 50 °C apresentaram resultados semelhantes e um menor tempo de análise em relação à 30 °C, por isso optou-se por fixar seu valor em 40 °C para maximizar a vida útil da coluna. A taxa de vazão demonstrou ter um efeito estatisticamente significativo sobre a cauda do pico, o que levou a necessidade de otimizar este parâmetro em fase subsequente.

A partir dos resultados obtidos na triagem, foi possível definir a temperatura da coluna em 40 °C e selecionar faixas mais estreitas de vazão e porcentagem de metanol. Um novo DoE foi aplicado para otimização do método e obteve-se o MODR com bordas da região do hipercubo de 0,21 a 0,24 mL/min para a taxa de vazão e

32,00 a 33,23 para percentagem de metanol. As condições finais selecionadas foram: fase móvel composta por tampão acetato de amônio 10 mM e metanol (70:30, v/v) com pH ajustado para 6,5; coluna analítica Waters Acquity UFLC® BEH (50 × 2,1 mm, 1,7 µm); taxa de vazão 0,15 mL/min; temperatura da coluna 40 °C; comprimento de onda de detecção 230 nm; e volume de injeção 5 µL.

A aplicação do QbD no desenvolvimento do método se provou produtiva e a aplicação de modelos matemáticos permitiu uma melhor compreensão dos efeitos dos CMPs sobre os CQAs. Além disso, os gráficos obtidos de *Sweet Spot*, *Contour plot* e MODR (Figuras 3,4,5 - Capítulo 1) a partir dos dados cromatográficos facilitaram a visualização e entendimento dos resultados. O método proposto foi validado de acordo com guias oficiais e legislação vigente. Comparado aos métodos de CLAE relatados na literatura, o método desenvolvido por CLUE apresentou uma redução no tempo de análise, 6 min *versus* 8 e 11 min, e consequente diminuição na geração de resíduos (EMANUELLI, SCHAPOVAL, 2020; TANTAWY et al., 2021). Além disso, este foi o primeiro método indicativo de estabilidade por CLUE aplicando a abordagem AQbD para a determinação de OMG em forma farmacêutica, contribuindo para análises de rotina para determinação de OMG e seus produtos de degradação.

Após a validação do método por CLUE, amostras de OMG foram novamente submetidas a degradação forçada (nas condições previamente definidas) e analisadas pelo método proposto. O método foi capaz de separar os produtos de degradação com resolução adequada ($R_s > 1,5$) e dados de pureza indicaram que não houve interferência no pico de OMG, comprovando a capacidade do método em indicar estabilidade.

Na análise por CLUE, foi possível detectar sete picos de degradação: DP-1 (por hidrólise alcalina); DP-2 (por hidrólise ácida); DP-3.1, DP-3.2 e DP-3.3 (por radiação UV-C); DP-4 (por exposição térmica); e DP-5 (por degradação oxidativa). Não houve formação de pico adicional a partir da exposição à radiação UV-A. Os produtos de degradação encontrados nas condições alcalina, ácida e térmica (DP-1, DP-2 e DP-4) pareceram ser os mesmos, pois todos apresentaram o mesmo tempo de retenção (Figura 1 - Capítulo 2). Este foi o primeiro método relatado capaz de detectar um produto de degradação formado por exposição térmica e nosso grupo de pesquisa continua sendo o único a descrever produtos obtidos por degradação fotolítica (UV-C).

Além da aplicabilidade de ser indicativo de estabilidade, o método de CLUE foi desenvolvido de modo a ser compatível com acoplamento com a EM, visando estudos futuros de isolamento e identificação de produtos de degradação formados. Por motivos operacionais, no período dos testes, não foi possível realizar a análise LC-EM para investigar os produtos de degradação. Porém, foi possível realizar análise de EM por infusão direta, utilizando um micrOTOF-Q III, um espectrômetro de massas híbrido com analisadores de quadrupolo e tempo de voo, o que proporcionou análises com alta resolução e precisão de massas. A análise foi realizada em amostras de OMG submetidas a degradação por oxidação, hidrólise alcalina e fotólise (Capítulo 2).

A degradação oxidativa de um fármaco envolve o mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos. Aminas, sulfetos e fenóis são suscetíveis à oxidação, podendo levar a formação de N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxidos (BLESSY et al., 2014). As amostras de OMG submetidas a degradação oxidativa, analisadas por EM, apresentaram a formação de três produtos de degradação, de relação massa/carga (m/z) 321, 337 e 415. O produto m/z 321 é formado a partir da perda do grupo sulfonamida presente na molécula, o m/z 415 é formado por uma reação de N-oxidação, enquanto o m/z 337 é formado por ambos os mecanismos. Os resultados encontrados corroboram com outras pesquisas relatando os mesmos produtos (EMANUELLI, SCHAPOVAL, 2020; TANTAWY et al., 2021).

A hidrólise é uma das reações de degradação mais comuns que ocorre quando uma molécula é quebrada em moléculas menores na presença de água. As reações de hidrólise tipicamente envolvem a catálise, por ácido ou base, de grupos funcionais ionizáveis presentes na molécula. A análise por EM das amostras de OMG submetidas a hidrólise alcalina possibilitou a identificação da formação de dois produtos de degradação: m/z 321 e 387. Uma patente de proposta de formulação para comprimidos contendo OMG já havia relatado a sensibilidade desta molécula frente ao meio ácido e alcalino, formando o produto de m/z 321 (COOPER et al., 2018). Porém, este foi o primeiro trabalho a identificar o produto m/z 387 formado nestas condições.

A fotólise é a degradação de compostos químicos causados pela exposição à luz. Condições de estresse leve podem induzir foto-oxidação pelo mecanismo de radicais livres. Grupos funcionais como carbonilas, nitro aromáticos, N-óxido, alcenos, cloretos de arila, sulfetos, entre outros podem introduzir fotossensibilidade a

medicamentos (BLESSY et al., 2014). As amostras de OMG submetidas a fotólise (por radiação UV-C) foram avaliadas em três tempos de exposição (15, 30 e 45 min). Com 15 e 30 min de exposição foi possível identificar por EM a formação do produto de degradação m/z 369. Com 45 min, além do produto m/z 369, houve a formação dos produtos de m/z 337, 229, 293 e 415. Este foi o primeiro trabalho a identificar por EM os produtos de degradação de OMG sob condição fotolítica. Todos os produtos identificados por EM tiveram suas estruturas propostas (Figura 3 – Capítulo 2).

Experimentos adicionais são necessários para confirmação das estruturas propostas para os produtos de degradação formados, assim como rotas de degradação. Porém, ressalta-se que o método por CLUE desenvolvido neste trabalho utilizou tampão acetato de amônio como fase móvel aquosa, portanto, pode ser eficientemente empregado em estudos subsequentes de LC-EM.

Além das análises por CLUE e EM, também foram realizados estudos de toxicidade em amostras com produtos de degradação e OMG pura para avaliar a sua segurança (Capítulo 2). Dois ensaios de viabilidade celular foram realizados em amostras de OMG pura e amostras de OMG submetidas a degradação forçada por hidrólise alcalina, fotólise (por radiação UV-C) e oxidação. As amostras na concentração final de 500 μ M foram incubadas em células 3T3 durante 24 h à 37 °C. Após o período, foram seguidos os protocolos específicos dos ensaios de viabilidade celular por redução de tetrazólio e incorporação de vermelho neutro.

O ensaio de redução de tetrazólio avalia a redução do MTT em cristais de formazan por desidrogenases celulares, o que só ocorre quando as enzimas mitocondriais estão ativas. Já o ensaio de incorporação de vermelho neutro, avalia a capacidade dos lisossomos de células viáveis para incorporar o corante. Sendo assim, se as células morrerem devido a alguma toxicidade das amostras, elas perdem a capacidade de converter o reagente utilizado, justificando o amplo emprego destes ensaios para medir os efeitos citotóxicos de drogas em linhagens celulares (GIORDANI et al., 2019; WINGERT et al., 2019).

Este foi o primeiro trabalho a investigar o potencial citotóxico de amostras de OMG submetidas a degradação forçada. Em ambos ensaios realizados, as amostras de OMG sob condição de estresse de oxidação apresentaram citotoxicidade significativa ($p < 0,05$, ANOVA/Bonferroni). As amostras de OMG submetidas à hidrólise alcalina e fotólise, assim como a amostra de OMG pura, não apresentaram

alteração significativa na viabilidade celular (Fig. 4 – Capítulo 2). Os resultados encontrados contribuem para estabelecer a segurança destes produtos, evidenciando que estudos suplementares acerca dos mecanismos de toxicidade são necessários.

7. CONCLUSÃO GERAL

- Foi possível desenvolver um método indicativo de estabilidade por CLUE robusto, simples e rápido para determinação de OMG em forma farmacêutica;
- O estudo e a aplicação dos princípios do QbD na etapa de desenvolvimento do método analítico possibilitaram uma melhor compreensão dos efeitos dos parâmetros do método sobre os atributos de qualidade;
- O método proposto foi validado seguindo diretrizes oficiais e apresentou bons resultados e adequação para análise de rotina de OMG e seus produtos de degradação;
- O método desenvolvido por CLUE foi capaz de detectar sete compostos formados por degradação forçada, sob condição de hidrólise ácida e básica, oxidação, térmica e fotólise;
- Amostras submetidas a degradação por hidrólise alcalina, oxidação, e fotólise foram analisadas por EM. Foi possível identificar sete massas exatas de produtos de degradação e propor as suas estruturas;
- Ensaio de viabilidade celular foram realizados para avaliar a citotoxicidade de amostras de OMG submetidas a degradação por hidrólise alcalina, oxidação, e fotólise. As amostras de OMG sob condições de estresse oxidativo apresentou citotoxicidade, reforçando a importância de estudos de segurança;
- A investigação dos produtos de degradação de OMG colaboram para assegurar a eficácia terapêutica, segurança e qualidade do medicamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, C. et al. Effects of Age, Sex, and Obesity on the Single-Dose Pharmacokinetics of Omarigliptin in Healthy Subjects. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 5, n. 5, p. 374–382, 2016.

ALSANTE, K. M. et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29–37, 2007.

ÅSBERG, D. et al. A quality control method enhancement concept—Continual improvement of regulatory approved QC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 273–281, 2016.

ASHOK, K. et al. UPLC a preeminent technique in pharmaceutical analysis. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 69, n. 3, p. 371–380, 2012.

ATTALLAH, M. A. et al. Analysis and bio-analysis of omarigliptin, trelagliptin and alogliptin: Applied to biological samples and degradation kinetic study. **Microchemical Journal**, v. 148, p. 253–261, 2019.

AYOUB, B. M. et al. Repurposing of omarigliptin as a neuroprotective agent based on docking with A2A adenosine and AChE receptors, brain GLP-1 response and its brain/plasma concentration ratio after 28 days multiple doses in rats using LC-MS/MS. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 889, 2021.

AYOUB, B. M.; MOWAKA, S.; ARAFA, M. G. Factorial design optimization of micelle enhanced synchronous spectrofluorimetric assay of Omarigliptin: Applied to content uniformity testing and in vitro drug release. **Luminescence**, v. 33, p. 797–805, 2018.

BANDOPADHYAY, S. et al. Integrated analytical quality by design (AQbD) approach for the development and validation of bioanalytical liquid chromatography method for estimation of valsartan. **Journal of Chromatographic Science**, v. 58, n. 7, p. 606–621, 2020.

BHUTANI, H. et al. Quality by Design (QbD) in Analytical Sciences: An Overview. **Pharma Times**, v. 46, p. 71-75, 2014.

BIFTU, T. et al. Omarigliptin (MK-3102): A novel long-acting DPP-4 inhibitor for once-weekly treatment of type 2 diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3205–3212, 2014.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, p. 159–165, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta de Medicamento: Gliptina, 2022. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, Poder Executivo, de 05 de dezembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. GUIA nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 04 de dezembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, Poder Executivo, de 25 de novembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, Poder Executivo, de 07 de novembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. GUIA nº 28, versão 1, de 11 de novembro de 2019. Guia de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 11 de novembro de 2019.

BURNESS, C. B. Omarigliptin: First Global Approval. **Drugs**, v. 75, n. 16, p. 1947–1952, 2015.

COOPER, V. B. et al. Oral pharmaceutical formulation of omarigliptin. U.S. Patent n. 9937153B2, 10 abr. 2018. Disponível em:<
<https://patentimages.storage.googleapis.com/bc/1c/88/db498be6959595/US9937513.pdf>> Acesso em: 05 de abril de 2023.

DEACON, C. F. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, p. 642–653, 2020.

DEIDDA, R. et al. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 110-121, 2018.

ELLWANGER, J. B. et al. Analytical Quality by Design Approach for a Stability-Indicating Method to Determine Apixaban and Its Related Impurities. **Chromatographia**, v. 83, n. 1, p. 65–75, 2020.

EMANUELLI, J.; SCHAPOVAL, E. E. S. Stability-Indicating HPLC method for estimation of omarigliptin in tablets – Oxidative and photolytic kinetics and degradation products formed under oxidative conditions. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105084, 2020.

Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, p. 1–15, 2015.

FUKUDA, I. M. et al. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 1-16, 2018.

GENUTH, S. M. et al. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes in America**, v. 2, n. 4, p. 1–39, 2015.

GIORDANI, C. F. A. et al. In vitro toxic evaluation of two gliptins and their main impurities of synthesis. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 1–9, 2019.

GKOUNTANAS, K. et al. Determination of Bupropion and Its Impurities via a Chaotropic Chromatography Method Following Analytical Quality-by-Design Principles for Method Development. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 10, 2022.

GURRALA, S. et al. Quality-by-Design Approach for Chromatographic Analysis of Metformin, Empagliflozin and Linagliptin. **Journal of Chromatographic Science**, v. 60, n. 1, p. 68–80, 2022.

HUBERT, C. et al. Improvement of a stability-indicating method by Quality-by-Design versus Quality-by-Testing: A case of a learning process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 401–409, 2014.

HUSSAIN, H. et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors as a potential target for diabetes: patent review (2015-2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 29, n. 7, p. 535–553, 2019.

IDF - International Federation of Diabetes. IDF Diabetes Atlas 10th edition, 2021. Disponível em: <<https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2022.

International Conference on Harmonization (ICH), Analytical Procedure Development Q14, p. 1-64, 2022.

International Conference on Harmonization (ICH), Pharmaceutical Development Q8(R2), p. 1–24, 2009.

International Conference on Harmonization (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), p. 1–13, 2005.

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

KELANI, K. M. et al. Univariate versus multivariate spectrophotometric methods for the simultaneous determination of omarigliptin and two of its degradation products. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 271, p. 120880, 2022.

LI, M. F. et al. Ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of omarigliptin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study in rats. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 10, 2017.

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

Marizev® Omarigliptin 12,5, 20mg: tablets. Merck Sharp & Dohme, 2020. Disponível em: <https://www.info.pmda.go.jp/go/pack/3969025F1022_1_10/> Acesso em: 31 de agosto de 2023).

MOWAKA, S. et al. Enhanced extraction technique of omarigliptin from human plasma—applied to biological samples from healthy human volunteers. **Molecules**, v. 25, n. 18, 2020.

MULVIHILL, E. E.; DRUCKER, D. J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. **Endocrine Reviews**, v. 35, p. 992–1019, 2014.

NAYAK, R. et al. Analytical quality by design-based LC-MS/MS method for the determination of Riociguat in its formulations. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 11, n. 12, p. 100–106, 2021.

OLEGÁRIO, S. N.; WINGERT, N. R.; STEPPE, M. Quality by design approach for enantiomeric evaluation by RP-HPLC method of Rivaroxaban and its chiral impurity. **Microchemical Journal**, v. 192, n. 108911, 2023.

PARK, G. et al. Analytical Quality by Design (AQbD) Approach to the Development of Analytical Procedures for Medicinal Plants. **Plants**, v.11, p. 2960, 2022.

PASQUINI, B. et al. Quality by Design as a risk-based strategy in pharmaceutical analysis: Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of nintedanib and its impurities. **Journal of Chromatography A**, v. 1611, p. 460615, 2020.

PERAMAN, R. et al. Analytical quality by design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual**, 2016.

SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590–611, 2018.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2022. Disponível em: <<https://diretriz.diabetes.org.br/>> Acesso em: 11 de fevereiro de 2022.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes: Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019 – 2020, 2020.

SESTI, G. et al. Ten years of experience with DPP-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v. 56, n. 6, p. 605–617, 2019.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57–66, 2003.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SINGH, A.; SINGH, P. Technical considerations of forced degradation studies of new drug substances and product: regulatory perspectives. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 8, p. 163-168, 2018.

STAJIĆ, A. et al. AQbD-Oriented UHPLC/MS/MS method development for glycopeptides assessment in pharmaceutical forms. **Journal of Chromatographic Science**, v. 59, n. 7, p. 650–658, 2021.

SUMAN, P. S. Implementation of Quality by Design Approach for Developing Chromatographic Methods with Enhanced Performance: A Mini Review. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 12-14, 2016.

TALEUZZAMAN, M. et al. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. **Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 1056, 2015.

TANTAWY, M. A. et al. Quality and stability profile assessment of the recent Antidiabetic Omarigliptin by using different chromatographic methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 59, p. 762–769, 2021.

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

WANG, L. et al. Simultaneous Quantification of Pioglitazone and Omarigliptin in Rat Plasma by UHPLC-MS/MS and Its Application to Pharmacokinetic Study after Coadministration of the Two Drugs. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2021, 2021.

WINGERT, N. R. et al. Application of Quality by Design to optimize a stability-indicating LC method for the determination of ticagrelor and its impurities. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 118, p. 208–215, 2018.

WINGERT, N. R. et al. In vitro toxicity assessment of rivaroxaban degradation products and kinetic evaluation to decay process. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 509–518, 2019.

World Health Organization (WHO): Classification of diabetes mellitus, 2019, Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/classification-of-diabetes-mellitus>> Acesso em: 31 de agosto de 2023.

World Health Organization (WHO): Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes HEARTS-D, 2020.