

GASPERIN, F.T.; LANGE, A.D.C.; SCHAPOVAL, E.E.S.; VOLPATO, N.M.
UFRGS - Faculdade de Farmácia - LCQFar - LEPCQ - Porto Alegre - RS - Brasil

INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM) é uma patologia de etiologia múltipla, decorrente da secreção e/ou ação inadequada de insulina. Constitui um grave problema de saúde pública, devido a sua alta frequência na população, suas complicações, altos custos financeiros e sociais envolvidos no tratamento desta patologia. O fosfato de sitagliptina (figura 1) é o primeiro medicamento de uma nova classe terapêutica, as gliptinas. A sitagliptina age inibindo a dipeptidil peptidase 4 (DDP-4), enzima que exerce importante papel no DM tipo 2.

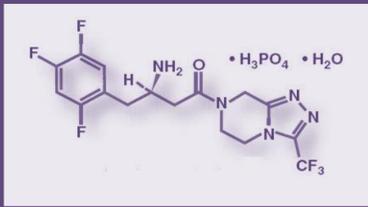


Figura 1. Estrutura química do fosfato de sitagliptina.

O fosfato de sitagliptina (STG), Januvia®, apresenta-se na forma de comprimidos revestidos de 25, 50 e 100 mg de STG (base livre). O desenvolvimento e a comercialização do produto são de responsabilidade da indústria Merk Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.

A eletroforese capilar (EC) é um método de separação de moléculas carregadas sob a influência de um campo elétrico. A EC teve um rápido avanço nas últimas décadas devido a simplicidade instrumental e principalmente a variedade de modos de separação que podem ser efetuados com um único capilar e da diversidade de compostos passíveis de análise em cada modo.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica por EC para a determinação quantitativa da STG em comprimidos revestidos, assim como determinar a cinética de fotodegradação do fármaco em solução metanólica.

MATERIAL E MÉTODO

- ✓ A substância química de referência (SQR) utilizada na análise foi o fosfato de STG com teor de 99,6%, fornecido por Sequoia Research Products (Oxford, UK).
- ✓ Januvia® 50 mg (lote D003817) obtido no comércio local.
- ✓ Sistema de eletroforese capilar HP3D - CE (AGILENT), com detector UV.
- ✓ Software HP Chemstation para o controle do sistema, aquisição e tratamento de dados.

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA POR EC

No desenvolvimento da técnica por EC testou-se diferentes condições experimentais relacionando as características do fármaco e do método, bem como a utilização de um padrão interno. As condições eletroforéticas utilizadas para a validação do método estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Condições eletroforéticas empregadas na validação do método analítico.

Característica	Descrição
Capilar de sílica fundida	48,5 cm (40,0 cm efetivo) e 50 µm diâmetro interno
Eletrólito	Tampão Tris:SDS (50 mM:75 mM) pH 10,6
Tensão aplicada	30 kV
Comprimento de onda	207 nm
Injeção hidrodinâmica	50 mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Ativação capilar	20 minutos NaOH 0,1M
Pré-condicionamento	5 minutos eletrólito
Temperatura de análise	25°C ± 1°C
Padrão Interno	Duloxetine (DLX)

O método foi validado de acordo com a RE n°899/2003 e o ICH, 2005. Os parâmetros analíticos avaliados foram linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.

A cinética de fotodegradação foi realizada em cubetas de quartzo contendo STG em solução metanólica frente à radiação UVC (254 nm) em tempos pré-estabelecidos (0; 0,5; 1; 2; 3; e 4 horas).

Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva padrão média (figura 2) na faixa de 50 a 150 µg/ml, obtida a partir de experimentos realizados em triplicata.

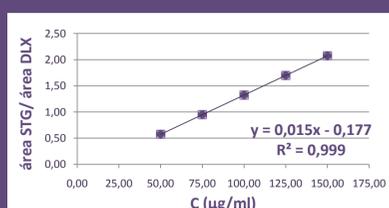


Figura 2. Representação gráfica da curva padrão do fosfato de sitagliptina SQR por EC.

A equação da reta foi determinada através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar o desvio da linearidade do método. Os resultados demonstraram que o método é linear na faixa de concentração estudada.

Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária (tabela 2).

O método demonstrou ser preciso, visto que, os desvios padrão relativos (DPR) mostraram-se menores que 2,0% e a precisão intermediária apresentou DPR de 1,83%. O valor percentual médio de STG foi de 98,80% do teor declarado.

Tabela 2. Resultados da precisão do método analítico por eletroforese capilar a 207 nm.

Amostras (n)	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	97,34	96,94	96,67
2	97,19	99,03	99,44
3	95,86	97,04	99,29
4	98,14	100,11	99,14
5	97,56	99,31	100,96
6	101,37	100,12	101,53
Média (%)	97,91	98,76	99,505
DPR (%)	1,89	1,45	1,71

Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. As quantidades adicionadas correspondem a 25, 50 e 75% do ponto inicial da curva (50 µg/ml). O método desenvolvido demonstrou ser exato, exibindo uma faixa de recuperação de 100,43% a 101,84%.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos eletroferogramas das soluções de STG 100 µg/ml com padrão interno duloxetine 30 µg/ml (DLX) e da amostra simulada dos excipientes (placebo) da formulação (figura 3). A especificidade também foi avaliada frente à interferência de prováveis produtos de degradação obtidos em condições de estresse (figura 4).

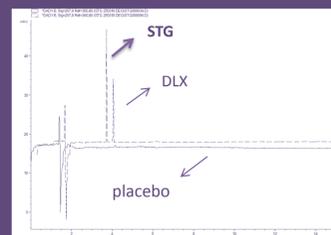


Figura 3. Eletroferograma da STG sobreposta ao placebo.

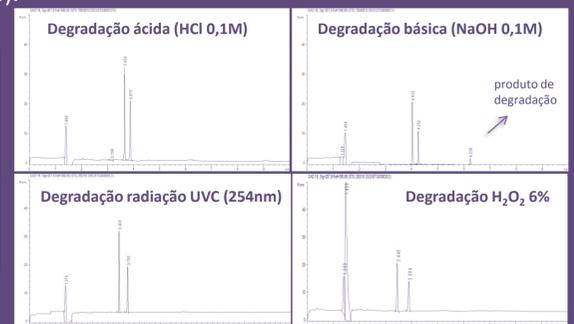


Figura 4. Eletroferogramas da STG submetida a condições de estresse.

Verificou-se que os excipientes da formulação não interferem na análise, assim como, os prováveis produtos de degradação formados. A pureza do pico foi avaliada, certificando que não há produtos de degradação eluindo no mesmo tempo de migração da STG, e conseqüentemente, interferindo na análise do fármaco.

Robustez: Plackett-Burman

No delineamento experimental Plackett-Burman seis fatores foram avaliados: pH, concentração do TRIS e SDS, temperatura de análise, comprimento de onda e tensão. Os resultados obtidos referem-se aos teores que variaram de 95,91% a 101,93%.

Através do teste *t* pode-se concluir que nenhum dos fatores estudados foram significativos, visto que, os valores de *t* calculados foram menores que o valor de *t* crítico 2,57 ($\alpha = 0,05$).

CINÉTICA DE FOTODEGRADAÇÃO

Considerando a fotossensibilidade da STG, observada nos resultados do estudo preliminar de estabilidade, realizou-se a cinética de fotodegradação. As velocidades de reação podem ser de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem. A ordem de reação é uma grandeza experimental determinada a partir da velocidade da reação química verificando-se a concentração das amostras retiradas no decorrer do tempo.

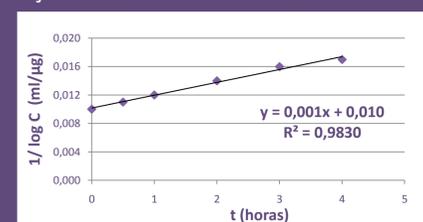


Figura 5. Representação gráfica da cinética de fotodegradação da STG frente à luz UVC por EC.

A partir dos gráficos obtidos, foi possível atribuir à reação de fotodegradação da STG em solução metanólica uma cinética de segunda ordem ($r^2 = 0,9830$).

CONCLUSÕES

O método desenvolvido por eletroforese capilar foi validado adequadamente e demonstrou ser linear, preciso, exato, específico e robusto, para a análise quantitativa da STG em comprimidos revestidos. A cinética de fotodegradação da STG pode ser descrita como cinética de segunda ordem.

REFERÊNCIAS

- ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. *Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis*. Trends in Analytical Chemistry, v. 17, p. 204-213, 1998.
- ANVISA. Resolução n°899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, 2003.
- ICH. Harmonised Tripartite Guideline. *Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1)*. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- SILVA, M. E. R. *Diabetes mellitus tipo 2*. Revista Brasileira de Medicina, São Paulo, v.58, p. 23-32, 2001.
- USP 31. *THE UNITED STATES Pharmacopoeia*. 31th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008.