

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

Os métodos analíticos quantitativos para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos devem permitir uma análise completa, contemplando a identificação, a determinação do teor de substância ativa, a identificação e determinação dos níveis de impurezas e produtos de degradação e a verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (WATSON, 1999).

O fosfato de sitagliptina é o primeiro fármaco de uma nova classe de medicamentos para o *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2). Foi aprovado pelo FDA (USA) e EMEA (CEE) em 2006, para o tratamento do DM2 em pacientes que não atingem o controle glicêmico com dieta e exercício físico (LAMBEIR *et al.*, 2008).

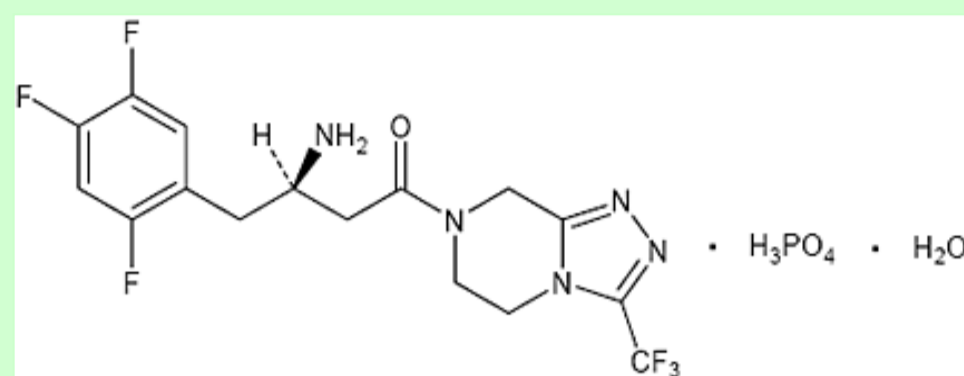


Figura 1. Estrutura química do fosfato de sitagliptina.

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 Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação quantitativa da STG em comprimidos revestidos, assim como, avaliar o potencial citotóxico dos produtos de degradação formados frente à luz UV-C.

## MATERIAL E MÉTODO

- ✓ STG substância química de referência (SQR) teor de 99,5% - (Sequoia Research Products, Oxford -UK);
- ✓ Januvia® 50 mg, lote E007074 (Merck Sharp & Dohme Pharmaceutical Ltda);
- ✓ Sistema de cromatografia Shimadzu 20A, com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20A/C, forno CTO-20A/C e detector PDA SPD-M20A.
- ✓ Software LC-Solution para o controle do sistema, aquisição e tratamento de dados.

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE

No desenvolvimento da técnica por CLAE realizou-se diferentes experimentos relacionando características do fármaco e do método. As condições ótimas utilizadas na validação do método estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na validação.

Característica	Descrição
Coluna	Waters -X Bridge™ C8 (250 mmx 4,6 mmx5 μm)
Fase Móvel	Trietilamina 0,3% : Acetonitrila (75:25; v/v), pH 4,0
Temperatura de análise	25 C
Deteção	207 nm
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 μL

O método foi validado de acordo com a RE nº 899/2003 e o ICH, 2005. Os parâmetros analíticos avaliados foram especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

## Linearidade

A linearidade foi avaliada através de uma curva padrão média (Figura 2) na faixa de concentração de 70 a 130 μg/mL de STG, obtida a partir de experimentos realizados em triplicata.

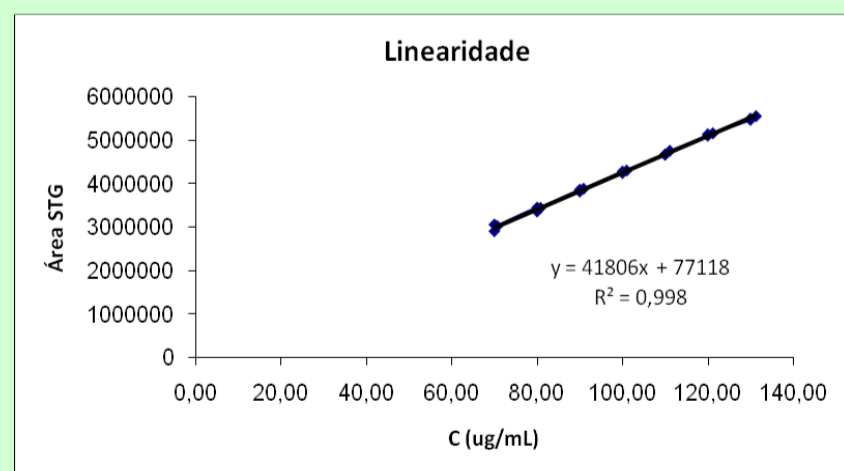


Figura 2. Representação gráfica da curva padrão do fosfato de sitagliptina SQR por CLAE.

A correlação linear entre as áreas médias obtidas em função da concentração de STG, assim como o estudo da regressão linear indicou que o método é linear na faixa de concentração estudada, visto que seu coeficiente de correlação aproxima-se a unidade com um  $r = 0,9992$ . A análise de variância (ANOVA) foi realizada e não foi observado desvio significativo da linearidade.

## Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos a partir dos dados da curva padrão de STG. Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação foram 0,0768 μg/mL e 0,2327 μg/mL, respectivamente.

## Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e da precisão interdia, que apresentou desvio padrão relativo (DPR) de 1,21%. Todos os valores de DPR abaixo de 2,0% indicam que o método é preciso. O teor médio interdia observado foi de 98,66% do valor declarado.

## 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 (70 μg/mL). O método desenvolvido demonstrou exatidão satisfatória, exibindo uma faixa de recuperação de 98,30% a 99,65% e a percentagem de recuperação média de 99,08%.

## Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da comparação dos cromatogramas das soluções de STG de 100 μg/mL e da amostra simulada dos excipientes da formulação (Figura 3). A especificidade também foi avaliada frente à interferência de prováveis produtos de degradação obtidos em condições de estresse (Figura 4).

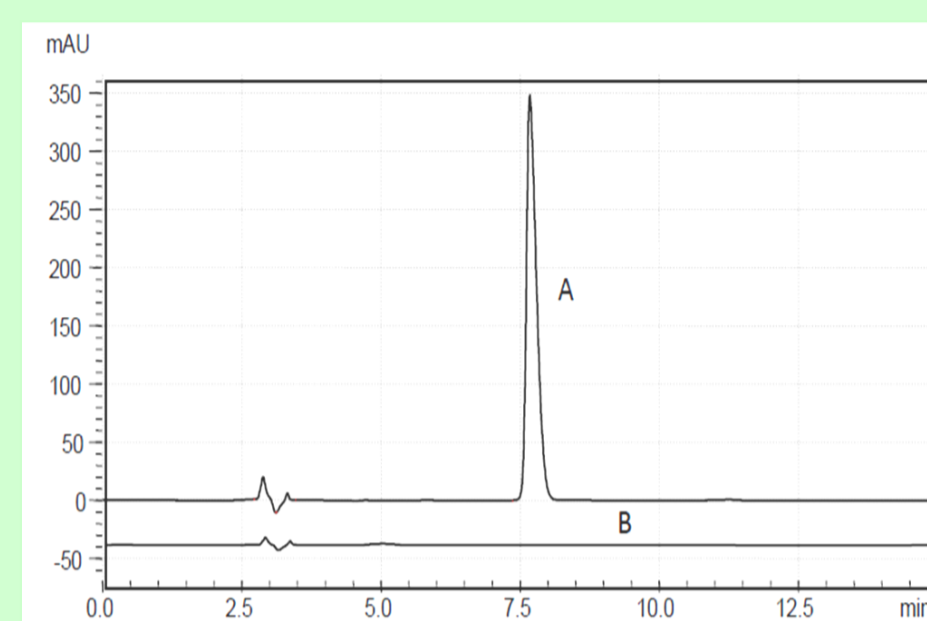


Figura 3. Cromatograma obtido através da análise por CLAE da solução de STG (A) sobreposta ao cromatograma da solução de excipientes (B).

Verificou-se que os excipientes da formulação não interferem na análise, bem como, os produtos de degradação formados. A pureza do pico da STG foi avaliada, o que assegura que não há interferência de produtos de degradação com mesmo tempo de retenção da STG.

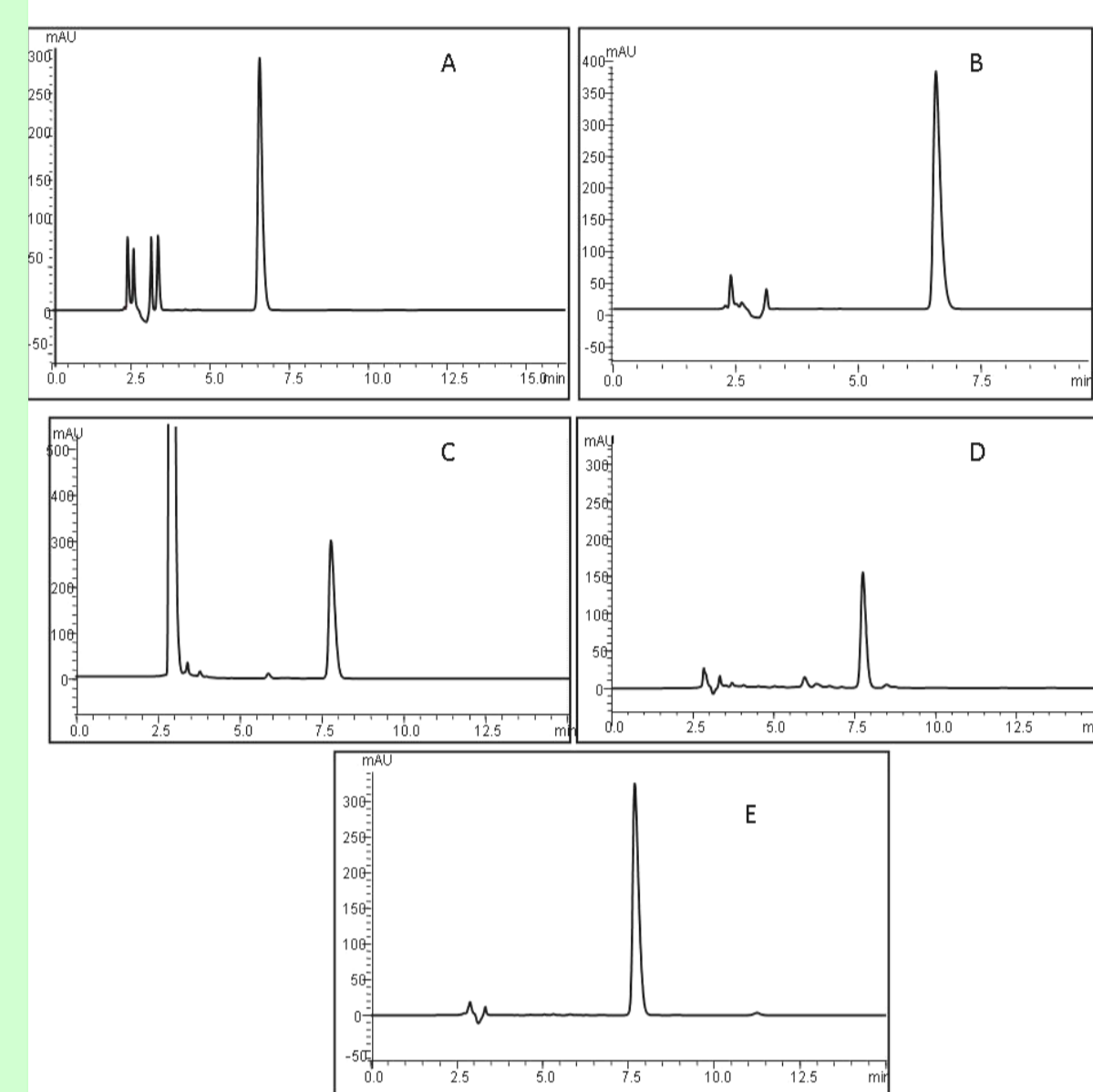


Figura 4. Cromatogramas mostrando a especificidade do método frente a degradação da STG em meio básico (A), ácido (B), peróxido (C), luz UV-C (D) e temperatura elevada (E).

## Robustez: Plackett-Burman

No delineamento experimental Plackett-Burman seis fatores foram avaliados: pH da fase móvel, porcentagem de solvente orgânico na fase móvel, fluxo, temperatura de análise, concentração de trietilamina (TEA) e coluna. Os resultados referem-se aos teores obtidos de STG nos comprimidos revestidos em relação à SQR, analisados sob as mesmas condições.

Tabela 2. Delineamento fatorial Plackett-Burman com as respostas obtidas para cada experimento.

n	pH	DUM MY	% Fase Orgânica	Fluxo	DUM MY	DUM MY	DUM MY	Temp.	% TEA	Coluna	DUM MY	Teor (%)
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	98,414
2	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	97,887
3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	98,323
4	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	97,921
5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	98,371
6	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	98,372
7	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	98,364
8	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	98,089
9	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	98,148
10	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	98,146
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	98,031
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98,173
$t_{calc}$	0,82		-0,70	0,29				0,31	-0,62	2,29		
$t_{crit}$	2,57											

Através do teste  $t$  pode-se concluir que nenhum dos fatores estudados foi significativo, visto que, os valores de  $t_{calculado}$  foram menores que o valor de  $t_{critico}$  ( $\alpha = 0,05$ ).

## ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata, utilizando células mononucleares e amostras de STG de 10, 50, 100, 200 e 500 μg/mL degradadas frente à luz UV-C por 4 horas. Os dados foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Duncan, quando o valor de  $F$  foi significativo.

Com isso, pode-se observar uma possível citotoxicidade dos produtos de degradação, nas concentrações acima de 50 μg/mL, pois os resultados demonstram que, acima desta concentração o potencial citotóxico mostra-se diferente do basal e branco. Contudo, não observamos uma relação direta da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH) com a concentração da amostra.

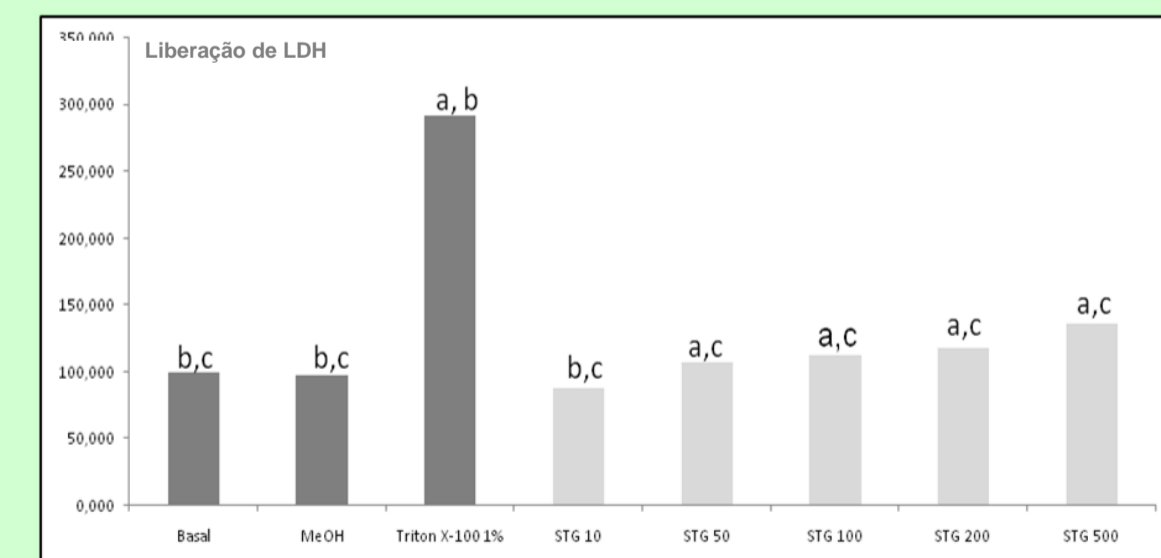


Figura 5. Resultados da citotoxicidade da sitagliptina. <sup>a</sup>valores significativamente diferentes do grupo controle; <sup>b</sup>valores significativamente diferentes das amostras de STG 50, 100, 200 e 500 μg/mL; <sup>c</sup>valores significativamente diferentes do Triton X-100.

## CONCLUSÕES

O método desenvolvido por CLAE foi validado e demonstrou ser específico, linear, sensível, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa da STG em comprimidos revestidos, e, portanto, é adequado para o controle de qualidade desse medicamento.

O ensaio de citotoxicidade demonstrou potencial citotóxico nas amostras degradadas pela luz UV-C com concentração inicial acima de 50 μg/mL.

## REFERÊNCIAS

- \*BRASIL. ANVISA. Resolução nº899 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.
- \*LAMBEIR A. M.; SHARPÉ S.; DE MUSTE I.; *DPP-4 INHIBITORS FOR DIABETES* –Departamento Pharmaceutical Sciences, University of pharmaceutical of Antwerp, Antwerp, Belgium, July, 2008.
- \*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 Pharmacopeia*. 31th Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.
- \*WATSON, D.G. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and Pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 1999. 337 p.