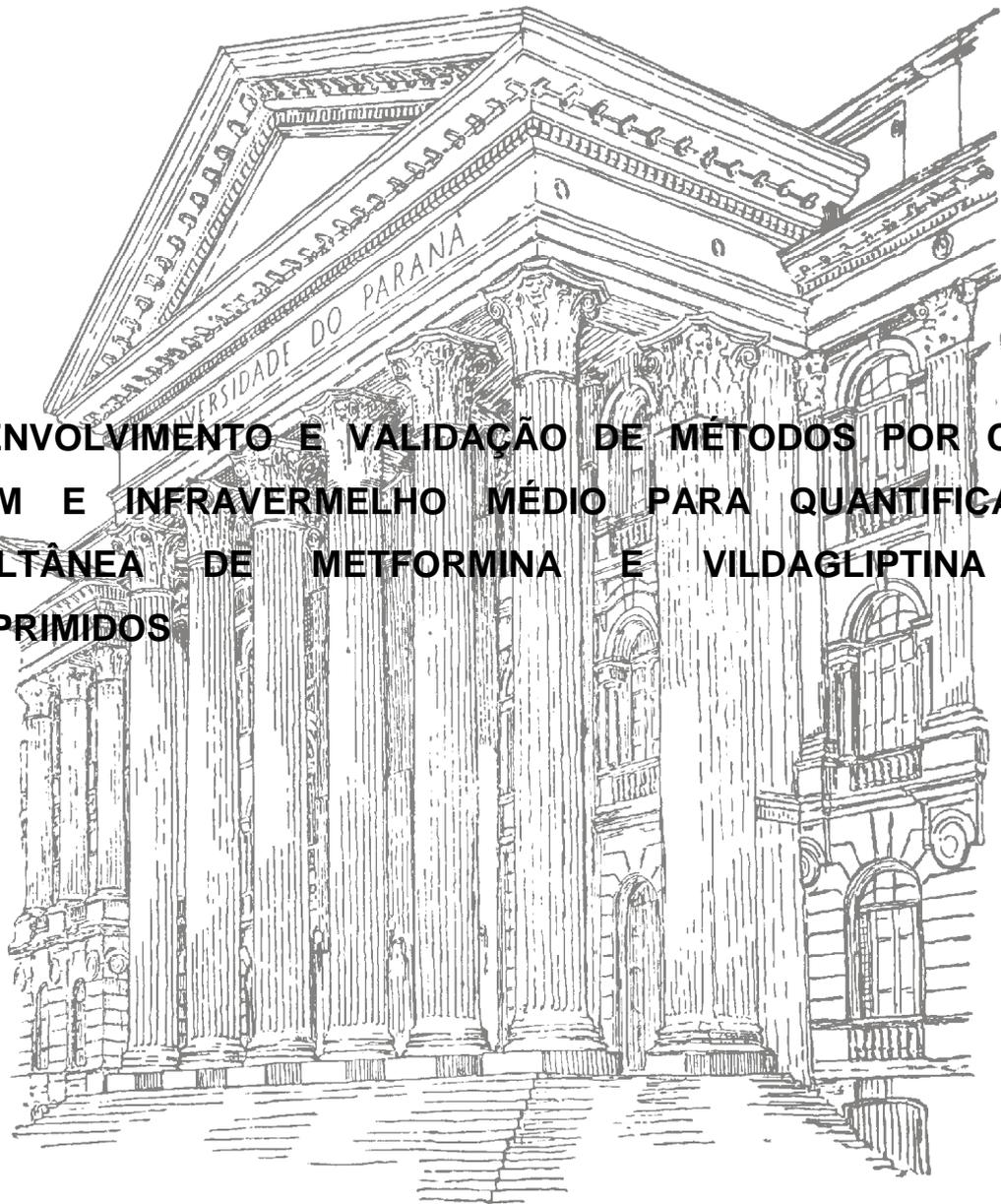


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE PAOLA UBER

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS POR CLAE-
EM/EM E INFRAVERMELHO MÉDIO PARA QUANTIFICAÇÃO
SIMULTÂNEA DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM
COMPRIMIDOS**



CURITIBA

2013

CAROLINE PAOLA UBER

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS POR CLAE-
EM/EM E INFRAVERMELHO MÉDIO PARA QUANTIFICAÇÃO
SIMULTÂNEA DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM
COMPRIMIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Linha de pesquisa Produção e Qualidade, Departamento de Farmácia do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientador: Dr. Marco André Cardoso

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

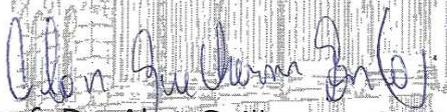
CAROLINE PAOLA UBER

Título: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS POR CLAE-EM/EM E INFRAVERMELHO MÉDIO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM COMPRIMIDOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador


Prof. Dr. Marco André Cardoso
Co-orientador


Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena
Universidade Federal de Minas Gerais

Curitiba, 28 de fevereiro de 2013.

Dedico, com carinho, aos meus pais
Odimar e Marlene Uber e ao meu irmão, Tamar.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por todas as graças recebidas.

Aos meus amados *Nossa Senhora, Jesus e São Miguel Arcanjo* por sua luz, sua proteção e por ajudar a manter minha fé inabalável. Agradeço por sua intercessão divina para que meus pedidos fossem atendidos.

Ao meu bem mais precioso, minha família *Odimar, Marlene e Thamar* que me apoiaram incondicionalmente nesta caminhada. Não há palavras que expressem o quanto vocês são importantes pra mim! Obrigada pelo apoio, pela paciência, pela compreensão, pelo carinho e pelas sábias palavras nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador *Professor Doutor Roberto Pontarolo* pela oportunidade de concretizar meu sonho de ser Mestre.

Ao meu co-orientador *Doutor Marco André Cardoso* por sua presença constante, sua mediação e suas palavras de incentivo.

Ao Professor *Doutor Marcelo Martins de Sena* e seus alunos *Msc. Bruno Gonçalves Botelho e Leandro Soares* por me auxiliarem com o infravermelho e a calibração multivariada.

Ao *Professor Doutor Itamar Andreazza* por me auxiliar na construção do placebo.

À minha querida amiga *Flávia Lada Degaut Pontes*, por me ajudar com os experimentos práticos, por dividir seus conhecimentos e por sua companhia. Obrigada pelas palavras carinhosas que só uma irmã mais velha sabe dizer.

Ao meu amigo *Mário Sérgio Piantavini* que dividiu todo seu conhecimento sobre infravermelho e calibração multivariada.

Aos meus queridos amigos de pós-graduação *Cleverson Ferreira Martins, Suzane Virtuoso, Helena Hiemisch Borba, Suelem Tavares da Silva Penteado, Raquel Vilhena, Juliana Cíbi Amorim, Samanta Golín, Giovanna Strapasson, Alexandra Czepula e Consuelo Reis Pereira*. Obrigada pela companhia para café, chimarrão, desabafos e incentivos. A companhia de vocês tornou a jornada mais leve.

Aos meus queridos amigos de estrada *Ana Flávia Marques, Tatiana Blachechen, Francielle Dechatnek, Andreia Mendes, Leandro Blachechen, Tiago Andrei Adamczewski, Juliano Schulle, Luzardo Machado e Eduardo Ramos*. Obrigada pelo seu carinho e apoio.

Aos meus colegas de pós-graduação *Leticia Bonâncio Cerqueira, Leticia Leonart, Sirlei Sayomi Hayashi, Thaís Martins Guimarães de Francisco, João Cleverson Gasparetto, Professora Doutora Francinete Ramos Campos, Rômulo Pereira Ribeiro, Ana Carolina Gimenez e Gisele Florianí*.

Às minhas gatinhas de estimação *Nescy e Lucy*. Seus ronronados são terapêuticos!

À *Capes*, pela bolsa de estudo concedida.

“Menor que meu sonho não posso ser”

O poema do andarilho – Lindolf Bell

RESUMO

Para o ano de 2025 estima-se que mais de 380 milhões de pessoas no mundo sejam diabéticas, sendo mais de 90% delas de *diabetes mellitus* tipo 2. Recentemente, está disponível no mercado um tratamento com a associação farmacêutica metformina (MET) e vildagliptina (VIL) que além de reduzir os níveis de glicose sanguínea e hemoglobina glicada diminui os eventos hipoglicêmicos e não promove aumento de peso ou retenção hídrica. A associação de fármacos é importante para a adesão ao tratamento, porém constitui-se em um desafio para o controle de qualidade. Por este motivo, este trabalho teve por objetivo desenvolver e validar métodos para a quantificação de VIL e MET por meio de duas técnicas distintas: CLAE-EM/EM e espectroscopia de infravermelho aliada à calibração multivariada usando PLS (IV-PLS). A primeira técnica é sensível e seletiva, ideal para quantificação simultânea dos fármacos e impurezas. A segunda é ecologicamente correta, sem uso de solventes orgânicos, não destrutiva, rápida e de baixo custo. As análises CLAE-EM/EM foram operadas com interface *electrospray*, no modo positivo de ionização através de um detector do tipo quadrupolo. A cromatografia foi realizada em coluna C8 (4,6x150 mm; 5 µm) à temperatura ambiente. A fase móvel consistiu em água:acetonitrila:ácido fórmico (80:20:0,1 v/v/v), fluxo de 800 µL/min em modo de eluição isocrática. Na validação o método mostrou-se seletivo, preciso (DPR<5%), linear ($r>0,99$) e exato (recuperação entre 98 e 108%). O ensaio de robustez mostrou que pequenas variações de fluxo, temperatura e proporção de ácido fórmico podem comprometer a exatidão dos resultados. O método foi aplicado com sucesso na determinação de teor em amostras adquiridas no comércio local que apresentaram teor de metformina e vildagliptina variando entre 102 e 104%. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença das impurezas da metformina. As análises IV-PLS foram realizadas em modo de refletância difusa, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} , 32 *scans* e temperatura e umidade controladas. Os dados foram tratados no *software* PLS-Toolbox 6.5 que opera em ambiente Matlab 7.13. O melhor modelo foi obtido por meio do algoritmo siPLS com intervalos de 50 variáveis, com pré-processamento SNV mais dados centrados na média, com 7 e 6 VLs para VIL e MET, respectivamente. Após a detecção de *outliers*, o conjunto de calibração de VIL e MET consistiu em 42 e 38 amostras e o de validação 23 e 20 amostras, respectivamente. Os valores de RMSEC e RMSEP para VIL foram 0,16 e 0,27 mg/0,1 g e para MET 1,44 e 3,95 mg/0,1 g. Na validação o método mostrou-se linear, preciso, com inverso da sensibilidade analítica de 0,003 mg/0,1 g para VIL e 0,004 mg/0,1 g MET e com erros sistemáticos desprezíveis e insignificantes. Os modelos apresentaram boa capacidade preditiva da concentração dos fármacos nas amostras reais de comprimidos, sendo de 80 a 90% das amostras analisadas estatisticamente semelhantes às analisadas por CLAE-EM/EM ($p>0,05$). Por fim, os métodos desenvolvidos podem ser considerados rápidos e eficientes para o controle de qualidade de VIL e MET em sua forma farmacêutica.

Palavras-chave: CLAE-EM/EM, infravermelho médio, PLS, metformina, vildagliptina.

ABSTRACT

More than 380 million people were expected to be diabetic in 2025 in which 90-95% of the cases will correspond to type 2 diabetes. Thus, the treatment to control the glycemic levels is indispensable. A new pharmaceutical association, metformin (MET) plus vildagliptin (VIL), is available on market and not only reduces the glycemic levels and glycosylated hemoglobin but also hypoglycemia, weight gain and edema are not observed. Despite the pharmaceutical association improves the therapeutic adherence the presence of more than one drug in a pharmaceutical product constitute a challenge to the quality control of drugs in their dosage form either. The present work was devoted to development and validation of a method for determination of VIL and MET by two techniques: LC-MS/MS and infrared spectroscopy with multivariate calibration (PLS-IR). The first technique is selective and sensible, ideal for simultaneous determination of the analytes and detection of their impurities. The second one is environmentally friendly, solvent free, non destructive, rapid and low cost. The analyses by LC-MS/MS were carried out with a triple quadrupole spectrometer equipped with an electrospray source, operated in positive ion mode. The chromatography separation was achieved in a C8 column (150x4,6 mm, 5 μ m), mobile phase of acetonitrile:water:formic acid 20:80:0,1 v/v/v, at flow rate 800 μ L/min. The method was selective, precise (RSD<5%), linear ($R>0,99$) and accurate (recovery ranging from 98-108%). The robustness study showed that modifications in flow rate, column oven temperature and percentages of formic acid influence the accuracy for both analytes. The method was successfully applied for commercial samples and the content range was 102-104% for MET and VIL. No impurities was detected in the analysis herein performed. The analyses by PLS-IR was carried out by diffuse reflectance mode and the spectra were recorded from 4000 to 400 cm^{-1} as the average of 32 scans, with a resolution of 4 cm^{-1} under controlled humidity and temperature. Data were handled using PLS-Toolbox 6.5 software operated in MATLAB 7.13 environment. The best model was obtained using the algorithm siPLS with interval size of 50, SNV plus median centered data preprocess with 7 and 6 LVs for VIL and MET, respectively. After outlier detection, the calibration data set of VIL and MET had 42 and 38 samples and the validation data set had 23 and 20 samples, respectively. The RMSEC and RMSEP values were 0.16 and 0.27 mg/0.1 g for VIL and 1.44 and 3.95 mg/0.1 g for MET. The methods were linear, precise, with inverse of analytical sensitivity 0.003 mg/0.1 g to VIL and 0.004 mg/0.1 g to MET and there were no systematic errors in the models. The models showed a good predictive ability in real samples, with 80-90% of the samples analyzed statistically similar to those analyzed by CLAE-EM/EM ($p> 0.05$). Therefore, both of the developed methods were considered fast and efficient for quality control of VIL and MET in tablets.

Key words: LC-MS/MS, mid-infrared, PLS, metformin, vildagliptin.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PREPARO DAS SOLUÇÕES DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE.	77
TABELA 2: PREPARO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO	79
TABELA 3: PARÂMETROS MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	80
TABELA 4: DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS CLORIDRATO DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA.	92
TABELA 5: COEFICIENTES ANGULARES PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE EM CLAE-EM/EM.	102
TABELA 6: LD E LQ DOS ANALITOS PELO MÉTODO DE CLAE-EM/EM.	103
TABELA 7: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA.	104
TABELA 8: RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO PARA A VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CLAE-EM/EM.....	106
TABELA 9: RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CALE-EM/EM.....	108
TABELA 10: RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CLAE-EM/EM.....	109
TABELA 11: RESULTADOS DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO	111
TABELA 12: RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM COMPRIMIDOS POR CLAE-EM/EM ..	113
TABELA 13: RESULTADOS DA MODELAGEM DOS DADOS ESPECTRAIS POR SIPLS PARA A VILDAGLIPTINA	120
TABELA 14: RESULTADOS DA MODELAGEM DOS DADOS POR SIPLS PARA A METFORMINA.....	122

TABELA 15: DETECÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS FÁRMACOS VILDAGLIPTINA E METFORMINA.....	126
TABELA 16: RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE IV-PLS PARA OS FÁRMACOS VILDAGLIPTINA E METFORMINA.	129
TABELA 17: RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE VILDAGLIPTINA POR CLAE-EM/EM E IV-PLS.	133
TABELA 18: RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE METFORMINA POR CLAE-EM/EM E IV-PLS	134

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA.....	51
QUADRO 2: MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA	57
QUADRO 3: MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA E METFORMINA	58
QUADRO 4: RELAÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	69
QUADRO 5: RELAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS.	70
QUADRO 6: TERMOS DESCRITIVOS PARA A DENOMINAÇÃO DA FAIXA DE SOLUBILIDADE.....	72
QUADRO 7: PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	83
QUADRO 8: ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS.....	83
QUADRO 9: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS A PARTIR DO PLANEJAMENTO.....	86
QUADRO 10: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO ELABORADAS A PARTIR DO PLANEJAMENTO.....	87
QUADRO 11: PARÂMETROS OTIMIZADOS PELO EXPERIMENTO DE MRM PARA A OBTENÇÃO DOS ÍONS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS.....	93
QUADRO 12: PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO, EM MODO POSITIVO, OTIMIZADOS PELO EXPERIMENTO FIA.	94
QUADRO 13: RESULTADOS DO MODELO DE CALIBRAÇÃO ESCOLHIDO PARA O DESENVOLVIMENTO DO IV-PLS PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA.....	127

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: A) AÇÕES DO HORMÔNIO INCRETINA GLP-1 EM DIFERENTES ÓRGÃOS E B) CÉLULAS PANCREÁTICAS.....	34
FIGURA 2: ANALISADOR DO TIPO QUADRUPOLO. DC: CORRENTE DIRETA. RF: RADIOFREQUÊNCIA.....	42
FIGURA 3: FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE CLORIDRATO DE METFORMINA (A) E SUAS IMPUREZAS 1-CIANOQUANIDINA OU IMPUREZA A (B), 1-METILBIGUANIDINA OU IMPUREZA B (C) E DIMETILMELAMINA OU IMPUREZA C (D).....	50
FIGURA 4: FÓRMULA ESTRUTURAL DA VILDAGLIPTINA COM DESTAQUE PARA A PARTE DA MOLÉCULA RESPONSÁVEL PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA DDP-4.....	56
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO VETOR DE NAS.	63
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PLANEJAMENTO DO TIPO COMPOSTO CENTRAL DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR IV-PLS	85
FIGURA 7: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA C18, FLUXO 300 µL/MIN, FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 10:90, V/V. A) SEM ADIÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO E B) COM ADIÇÃO DE 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.	95
FIGURA 8: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA C18, FLUXO 300 µL/MIN E FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA 10:90, V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.	96
FIGURA 9: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA FENIL, FLUXO 400 µL/MIN E FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 10:90 V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.	97
FIGURA 10: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA C8, FLUXO 400 µL/MIN E	

FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 10:90, V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.	98
FIGURA 11: CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE ACETONITRILA NA FASE MÓVEL. A) 10% DE ACETONITRILA; B) 15%; C)20% E D) 25%.	99
FIGURA 12: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE VILDALGIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDO A PARTIR DA FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 20:80, V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E FLUXO 800 µL/MIN. TEMPO TOTAL DE CORRIDA 3,5 MINUTOS.	100
FIGURA 13- CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TEMPERATURAS DA COLUNA.	101
FIGURA 14:LINEARIDADE DA VILDAGLIPTINA OBTIDA POR CLAE-EM/EM.	105
FIGURA 15: LINEARIDADE DA METFORMINA OBTIDA POR CLAE-EM/EM.	105
FIGURA 16: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO MÉDIO DA VILDAGLIPTINA EM PASTILHA DE KBR NO MODO TRANSMITÂNCIA.	114
FIGURA 17: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO MÉDIO DA METFORMINA EM PASTILHA DE KBR NO MODO TRANSMITÂNCIA.	115
FIGURA 18: VARIÁVEIS SELECIONADAS POR SIPLS PARA VILDAGLIPTINA NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO POR DRIFTS. REGIÕES 1093,8 - 1024,4 E 952,1 - 882,7 CM ⁻¹	124
FIGURA 19: VARIÁVEIS SELECIONADAS POR SIPLS PARA METFORMINA NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO POR DRIFTS. REGIÕES 3714,9 - 3645,5/ 3360,7 - 3291,3/ 3148,2 - 3078,8/ 2510,6 - 2441,2 E 881,3 - 811,8 CM ⁻¹	124
FIGURA 20: GRÁFICO DOS VALORES DE REFERÊNCIA VS PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO PARA A VILDAGLIPTINA.	130
FIGURA 21: GRÁFICO DOS VALORES DE REFERÊNCIA VS PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO PARA A METFORMINA.	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	– adenosina difosfato
AMP	– adenosina monofosfato
ANN	– redes neurais artificiais
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– ionização química à pressão atmosférica
ASTM	– <i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	– adenosina trifosfato
CAD	– gás de colisão
CE	– energia de colisão
CEP	– potencial de entrada na célula
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM/EM	– cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
CM	– centrado na média
Conc.	– concentração
CUR	– gás de interface
CV	– coeficiente de variação
CXP	– potencial de saída da célula
DM	– <i>Diabetes mellitus</i>
DMT2	– <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DclP	– potencial de desagrupamento
DP	– desvio padrão
DPP-4	– enzima dipeptidilpeptidase 4
DPR	– desvio padrão relativo
DRIFTS	–espectroscopia de infravermelho por refletância difusa com Transformada de Fourier
DV	– derivada
EM	– espectrometria de massas
EM/EM	– espectrometria de massas sequencial
EP	– potencial de entrada
ESI	– <i>electrospray ionization</i>

FIA	– análise por injeção em fluxo
FNT α	– fator de necrose tumoral alfa
FT	– transformada de Fourier
FTIR	– espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier
G	– medicamento genérico
GIP	– <i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLP-1	– <i>glucagon-like peptide 1</i>
GLP-1R	– receptores de GLP-1
GLUT	– transportador de glicose
GS1	– gás de nebulização
GS2	– gás secante
HbA _{1c}	– hemoglobina glicada
HDL	– lipoproteínas de alta densidade
HPC	– hidroxipropilcelulose
HPMC	– hidroxipropilmetilcelulose
ICH	– <i>International Conference on Harmonisation's</i>
IKK	– inibidor de kB quinase
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRS	– Proteínas substrato do receptor de insulina
IS	– voltagem do capilar
IV	– infravermelho
IV-PLS	– infravermelho aliado à ferramenta de mínimos quadrados parciais
KNN	– k-ésimo vizinho mais próximo
LD	– limite de detecção
LDA	– análise discriminante linear
LDL	– lipoproteínas de baixa densidade
LQ	– limite de quantificação
<i>m/z</i>	– relação massa/carga
Met.	– metformina
MLR	– regressão linear múltipla
MRM	– <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MSC	– correção do espalhamento multiplicativo

NAS	– sinal analítico líquido
PCA	– análise por componentes principais
PCR	– regressão por componentes principais
PLS	– mínimos quadrados parciais
PLS-DA	– análise discriminante por mínimos quadrados parciais
Pré-proces.	– pré-processamento
PRESS	– soma dos quadrados dos erros de previsão
R	– medicamento referência
RMSEC	– raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração
RMSECV	– raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada
RMSEP	– raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão
RNA	– ácido ribonucleico
RPD	– desvio residual padrão
RPM	– rotações por minuto
S	– medicamento similar
SDV	– desvio padrão dos erros de validação
SEL	– seletividade
SEN	– sensibilidade
SIMCA	– <i>Soft Independent Modelling of Class Analogy</i>
siPLS	– mínimos quadrados parciais por sinergismo de intervalo
SNV	– variação normal padrão
TZD	– tiazolineodionas
USP	– Farmacopéia Americana
v/v	– volume/volume
Vil.	– vildagliptina
VL	– variável latente

LISTA DE SÍMBOLOS

β	– beta
α	– Alfa
κ	– Capa
K	– potássio
r	– coeficiente de correlação
b	– coeficiente de regressão
$\ \cdot \ $	– norma Euclidiana de um vetor
γ	– sensibilidade analítica
γ^{-1}	– inverso da sensibilidade analítica
ε	– ruído
v	– número de graus de liberdade
n	– número de amostras
π	– pi
O	– oxigênio
N	– nitrogênio
H	– hidrogênio
C	– carbono

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 DIABETES MELLITUS	26
3.2 CLASSIFICAÇÃO	26
3.3 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2	27
3.3.1 Mecanismos celulares de resistência à insulina	28
3.3.2 Disfunção das células β	30
3.3.3 Disfunção das células α	32
3.3.4 Hormônios do efeito incretina	33
3.4 DIAGNÓSTICO	35
3.5 TRATAMENTO	35
3.5.1 Sulfoniluréias	36
3.5.2 Glinidas	36
3.5.3 Tiazolinedionas ou glitazonas	37
3.5.4 Inibidor de alfa-glucosidase	37
3.5.5 Biguanidas	37
3.5.6 Gliptinas	38
3.6 ASSOCIAÇÃO DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA	39
3.7 CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	40
3.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO ALIADA À QUIMIOMETRIA	43
3.8.1 Detecção de outliers	47
3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLORIDRATO DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA	49
3.9.1 Metformina	49
3.9.2 Vildagliptina	55
3.9.3 Metformina e vildagliptina	57
3.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	58
3.10.1 Validação para CLAE-EM/EM	59
3.10.1.1 Seletividade/Especificidade	59
3.10.1.2 Linearidade	59
3.10.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	60
3.10.1.4 Intervalo	60
3.10.1.5 Precisão	61
3.10.1.6 Exatidão	62
3.10.1.7 Robustez	62
3.10.2 Figuras de mérito em calibração multivariada	63
3.10.2.1 Seletividade	64
3.10.2.2 Linearidade	64
3.10.2.3 Sensibilidade	65
3.10.2.4 Sensibilidade analítica	65
3.10.2.5 LD e LQ	66
3.10.2.6 Teste para erro sistemático (<i>bias</i>)	66

3.10.2.7 Precisão e exatidão.....	67
3.10.2.8 Desvio residual de previsão	68
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 MATERIAL	69
4.1.1 Padrões analíticos e amostras comerciais	69
4.1.2 Instrumentação.....	70
4.1.3 Consumíveis.....	71
4.1.4 Reagentes e solventes.....	71
4.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS	72
4.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	73
4.3.1 Preparo da fase móvel	73
4.3.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho	73
4.3.3 Otimização do Espectrômetro de Massas.....	73
4.3.4 Otimização do método cromatográfico.....	75
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-EM/EM.....	75
4.4.1 Seletividade.....	75
4.4.2 Limite de detecção e quantificação	76
4.4.3 Linearidade e intervalo	77
4.4.4 Precisão	78
4.4.5 Exatidão	78
4.4.6 Robustez	80
4.4.7 Teste de estabilidade	80
4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS VIA CLAE-EM/EM	81
4.5.1 Teste de extração dos fármacos da forma farmacêutica.....	81
4.5.2 Preparo dos comprimidos para determinação dos fármacos	81
4.6 PARÂMETROS DO MÉTODO CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS METFORMINA E VILDAGLIPTINA	82
4.7 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IV-PLS.....	84
4.7.1 Planejamento das amostras.....	84
4.7.2 Preparo das amostras e aquisição dos espectros de infravermelho	85
4.7.3 Construção dos modelos de calibração multivariada	88
4.7.4 Detecção de <i>outliers</i>	89
4.7.4.1 Detecção de <i>outliers</i> no conjunto de calibração	89
4.7.4.2 Detecção de <i>outliers</i> no conjunto de validação	89
4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO IV-PLS	89
4.8.1 Linearidade.....	89
4.8.2 Precisão	90
4.9 DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM AMOSTRAS REAIS	90
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS	92
5.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	93
5.2.1 Otimização dos parâmetros do analisador e fonte de ionização do espectrômetro de massas	93
5.2.2 Otimização do método cromatográfico.....	94
5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	102
5.3.1 Seletividade.....	102
5.3.2 Limites de detecção e quantificação	102
5.3.3 Linearidade e intervalo	103
5.3.4 Precisão	106

5.3.5 Exatidão	107
5.3.6 Robustez	109
5.4 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO	110
5.5 DETERMINAÇÃO, VIA CLAE-EM/EM, DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM COMPRIMIDOS	111
5.5.1 Teste de extração dos fármacos	111
5.5.2 Quantificação dos fármacos antidiabéticos nas amostras comerciais.....	112
5.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IV-PLS.....	113
5.6.1 Espectros de infravermelho médio de vildagliptina e metformina.....	113
5.6.2 Planejamento das amostras	115
5.6.3 Construção dos modelos usando PLS	117
5.6.4 Detecção de <i>outliers</i>	125
5.6.5 Validação do método IV-PLS	127
5.7 DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS POR IV-PLS E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO CLAE-EM/EM	132
6 CONCLUSÃO	135
7 REFERÊNCIAS.....	137

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* corresponde a um grupo de desordens metabólicas que resultam na hiperglicemia sanguínea e sua principal causa é a deficiência de secreção de insulina, deficiência na ação de insulina ou ambas (SBD, 2009). O hormônio insulina é responsável pela absorção de glicose pelos tecidos e também por seu armazenamento em músculos, fígado e tecido adiposo promovendo a diminuição de glicose sanguínea após a alimentação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2005).

No ano de 2000, o *diabetes mellitus* atingiu aproximadamente 131 milhões de pessoas e, em 2030, deve alcançar em torno de 300 milhões. No Brasil, para o mesmo período, o número de pessoas com diabetes deve passar de 4,6 para 11,3 milhões (WILD *et al.*, 2004). Os custos diretos como medicações, hospitalizações e consultas, e os custos indiretos relacionados a óbitos prematuros, ociosidade e incapacidade de trabalho somaram aproximadamente 22,6 bilhões de dólares no ano de 2000 para os cofres brasileiros (BARCELO *et al.*, 2003).

Os custos gerados pela doença se devem, em parte, a cronicidade do diabetes. A longo prazo, a hiperglicemia provoca danos, disfunções e falência de inúmeros órgãos causando retinopatia, nefropatia, neuropatias, amputações e aumentos na incidência de aterosclerose, hipertensão e doenças cerebrovasculares (ADA, 2011).

Atualmente, o *diabetes mellitus* é classificado em tipo 1 e tipo 2. No tipo 1, ocorre a destruição total ou parcial das células β -pancreáticas ocasionando a deficiência de secreção de insulina. A causa geralmente é autoimune e se manifesta na infância ou adolescência. No *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), que representa mais de 90% dos casos de diabetes, sua etiologia não é totalmente compreendida. O DMT2 costuma se manifestar depois dos 40 anos de idade e os pacientes são geralmente obesos. A obesidade é um dos principais fatores associados à resistência a insulina (SBD, 2009; ADA, 2011).

O tratamento de paciente com DMT2 objetiva valores de glicose sanguínea menores que 100 mg/dl e hemoglobina glicada (HbA_{1C}) igual ou inferior a 7% (SBD,

2009). A hemoglobina glicada é um marcador da doença, pois reflete os valores de glicose no sangue dos últimos 2 a 3 meses (ADA, 2011).

Um estudo realizado pelo *United Kingdom Prospective Diabetes Study* demonstrou que a redução de 1% na HbA_{1C} corresponde a redução de 37%, 43%, 21% e 14% de complicações microvasculares, amputações ou doenças vasculares periféricas, mortalidade e incidência de infarto do miocárdio, respectivamente (CAMPBELL, 2009). Portanto, um tratamento eficaz aos pacientes com DMT2 é necessário para melhorar sua qualidade de vida e assegurar o controle glicêmico em níveis considerados normais.

O tratamento do *diabetes mellitus* se inicia com mudanças no estilo de vida, como alimentação controlada e exercícios físicos regulares. Na maioria dos casos, também é introduzido algum tipo de medicamento e a metformina é recomendada como primeira linha no tratamento da doença. Porém, devido à cronicidade do DMT2 torna-se necessário a adição de outras terapias para auxiliar no controle glicêmico (CEFALU;URQUHART, 2007; CAMPBELL, 2009; NATHAN *et al.*, 2009).

Recentemente, uma nova classe terapêutica de antidiabéticos orais está sendo associada ao tratamento com metformina. A classe das gliptinas, representada por uma de suas integrantes, a vildagliptina, tem-se mostrado muito eficaz na redução dos níveis glicêmicos e também do controle da HbA_{1C} já demonstrados em vários estudos na literatura (BOLLI *et al.*, 2008; FERRANNINI *et al.*, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2010).

Uma das formas de garantir a segurança e eficácia do tratamento aos pacientes é assegurar que a associação dos fármacos, vildagliptina e metformina, se encontra na concentração correta na sua forma farmacêutica.

Assim, é necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de quantificar esses fármacos simultaneamente, bem como, a quantificação ou detecção de impurezas da metformina.

As técnicas analíticas que podem ser adotadas para este fim são a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) e a espectroscopia de absorção no infravermelho aliada à calibração multivariada. A CLAE-EM é uma técnica bastante sensível e específica enquanto que a espectroscopia de infravermelho é uma técnica que requer menos preparo de amostra, mas exige um tratamento estatístico (calibração multivariada) mais

sofisticado (BLANCO *et al.*, 1998; COLLINS;BRAGA;BONATO, 2006; BUNACIU;ABOUL-ENEIN;FLESCHEIN, 2010).

Atualmente, a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) e a Farmacopéia Americana (USP, 2008) descrevem a determinação de metformina em sua forma farmacêutica isolada e somente a impureza A da metformina é identificada no ensaio de pureza. Além disso, a vildagliptina ainda não está descrita nestes compêndios oficiais.

Na literatura, somente um método foi encontrado para quantificação simultânea desses fármacos até o momento. Porém, o método CLAE- UV (ultra-violeta) apresenta algumas desvantagens como detecção ultravioleta em baixo comprimento de onda, uma longa corrida cromatográfica para somente dois fármacos e não há detecção de impurezas da metformina. Além disso, não foi encontrado na literatura nenhum método para determinação simultânea dos fármacos por meio de IV médio e calibração multivariada. Desta forma, o presente trabalho justifica o desenvolvimento dos métodos analíticos já citados para a associação farmacêutica dos antidiabéticos orais metformina e vildagliptina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos para o controle de qualidade da associação de antidiabéticos orais cloridrato de metformina e vildagliptina assim como, dos compostos relacionados do cloridrato de metformina, utilizando como ferramentas analíticas a cromatografia de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e a espectroscopia de infravermelho aliada a calibração multivariada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver um método para quantificação simultânea de vildagliptina, cloridrato de metformina e seus compostos relacionados através de CLAE-EM/EM;

Desenvolver um método para quantificação simultânea de vildagliptina e cloridrato de metformina empregando espectroscopia de infravermelho e calibração multivariada;

Validar os métodos desenvolvidos;

Aplicar os métodos desenvolvidos em produtos comerciais contendo a associação farmacêutica dos antidiabéticos orais;

Comparar os resultados dos métodos desenvolvidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES MELLITUS

Caracterizado como um grupo de doenças metabólicas que apresentam em comum resultado a hiperglicemia, o *diabetes mellitus* (DM) é causado pela deficiência de secreção ou ação de insulina ou ambas (SBD, 2009).

A hiperglicemia é responsável, em longo prazo, pelas complicações da diabetes, entre elas danos, disfunções e falência de inúmeros órgãos especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos ocasionando retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica, amputações, neuropatias autonômicas, disfunção sexual, aumento na incidência de aterosclerose, hipertensão e doenças cerebrovasculares (ADA, 2011).

O diabetes é uma doença de prevalência mundial e já atingiu cerca de 171 milhões de pessoas no ano de 2000 e, para 2030, são estimados mais de 300 milhões de indivíduos com a doença (WILD *et al.*, 2004; ADA, 2011). No Brasil, para o mesmo período, o número de pessoas com diabetes deve passar de 4,6 milhões para 11,3 milhões situando-se entre os dez países com maior prevalência da doença (WILD *et al.*, 2004). Em 2000, os gastos gerados pelo diabetes referentes à medicação, hospitalização e consultas alcançaram aproximadamente US\$ 3,9 bilhões no país. Além disso, considerando os custos indiretos como óbito prematuro, incapacidade de trabalho ou ociosidade a doença chega a custar US\$ 22,6 bilhões para a população brasileira (BARCELO *et al.*, 2003).

3.2 CLASSIFICAÇÃO

O diabetes, atualmente, é classificado segundo a sua etiologia e não quanto ao tipo de tratamento. Assim, a Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda a

eliminação dos termos insulino dependentes e insulino independentes e que se utilize as seguintes denominações: *diabetes mellitus* tipo 1 e *diabetes mellitus* tipo 2 (SBD, 2009).

O *diabetes mellitus* tipo 1 corresponde de 5 a 10% dos casos de diabetes e está associado a destruição total ou parcial das células β -pancreáticas que resulta na deficiência de secreção de insulina. A causa mais comum associada a esse tipo de diabetes é autoimune e sua manifestação geralmente acontece na infância e na adolescência. Pacientes com esse tipo de diabetes são raramente obesos, porém, necessitam de insulina exógena para sobreviver (SBD, 2009; ADA, 2011).

Diferentemente do tipo 1, o *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) está presente em 90 a 95% dos casos de diabetes e sua etiologia não é totalmente compreendida. O diagnóstico da doença é comum depois dos 40 anos de idade e geralmente se manifesta após estresse causado por outra doença, como uma infecção. Pacientes com DMT2 geralmente apresentam sobrepeso ou são obesos e a obesidade é um dos fatores associados à resistência a insulina. No DMT2, ao contrário do diabetes tipo 1, os pacientes não necessitam de insulina exógena para sobreviver, embora, em alguns casos o hormônio seja essencial para o controle da glicemia e diminuir os riscos de complicações macro e microvasculares característicos da doença (SBD, 2009; ADA, 2011).

3.3 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2

A insulina é secretada pelas células β -pancreáticas localizadas nas ilhotas de Langerhans. Em indivíduos normais, após a ingestão de uma alimentação rica em carboidratos, a elevação de glicose sanguínea promove a liberação de insulina que quando ligada aos seus receptores, promove uma cascata de sinalização levando a seus efeitos biológicos. Em doenças como o DMT2, a anormalidade da sinalização pela insulina nos tecidos muscular e adiposo, e em órgãos como o fígado e pâncreas, conduz a resistência à insulina e disfunção das células β (RHODES;WHITE, 2002).

3.3.1 Mecanismos celulares de resistência à insulina

Sendo o *diabetes mellitus* um conjunto de doenças metabólicas, os mecanismos de resistência à insulina são diversos e ligados aos órgãos e tecidos alvos da ação hormonal, entre eles o fígado, o pâncreas, o tecido muscular e o tecido adiposo.

A resistência hepática à insulina é uma das forças motrizes para a hiperglicemia no diabetes. Como o fígado é o principal responsável pela manutenção da normoglicemia no período de jejum, a insuficiência na ação de insulina em suprimir a produção de glicose no paciente com DMT2 conduz a aceleração desse processo, promovendo o aumento de glicose sanguínea (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

No tecido muscular, Shulman (2000) demonstrou em seus estudos que a síntese de glicogênio, forma como a glicose é armazenada, é uma das principais vias de metabolismo da glicose no organismo e que deficiências nos transportadores de glicose nas células musculares esqueléticas também fariam parte do provável mecanismo de resistência à insulina.

Os efeitos da insulina só são possíveis quando esta se liga e ativa seus receptores. Os receptores de insulina estão presentes em todos os tipos celulares variando apenas em sua expressão. Consistem em duas subunidades α extracelulares contendo o sítio de ligação à insulina e duas subunidades β com atividade tirosina quinase. Os resíduos destas subunidades β se autofosforilam quando ocorre a ligação da insulina e desencadeiam outras séries de fosforilações de diversas proteínas substrato do receptor de insulina (IRS, *insulin receptor substrate*). Estas proteínas IRS possuem uma importante função reguladora entre os receptores de insulina e os efeitos moleculares decorrentes da cascata de sinalização e estão envolvidas no crescimento de células somáticas, ação da insulina em tecido muscular, adiposo e fígado, crescimento e sobrevivência das células β -pancreáticas e ainda, desempenham função na ingestão de alimentos e reprodução (RHODES;WHITE, 2002).

Diversas proteínas IRS já foram identificadas incluindo proteína quinase ativada por mitógeno, c-Jun N-terminal quinase, proteína quinase C atípica e

fosfatidilinositol-3 quinase (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005). A estimulação pela insulina da via fosfatidilinositol-3 quinase nos tecidos muscular esquelético e adiposo aumenta a utilização de glicose por regular a expressão ou a localização subcelular dos transportadores de glicose GLUT4 e GLUT1 e estimula o armazenamento de glicose na forma de glicogênio ou triacilgliceróis. Além disso, a estimulação desta via estaria ligada a promoção da sobrevivência das células β -paciaélicas (SHULMAN, 2000; RHODES;WHITE, 2002).

A regulação negativa da cascata de sinalização da insulina pode ocorrer através da inativação das proteínas IRS por desfosforilação das cadeias laterais de tirosina através de proteínas celulares tirosino fosfatases e por fosforilação dos resíduos de treonina e serina das proteínas IRS. A fosforilação de resíduos de treonina e serina pela fosfotirosina fosfatase 1B reduz a habilidade das proteínas atuarem como substrato, pois inibe seu acoplamento aos receptores de insulina. A internalização dos receptores de insulina e a degradação das proteínas IRS também são meios de regulação negativa da cascata de sinalização (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

Fortemente associada a resistência à insulina e apontada como um dos principais fatores para esse processo, a obesidade geralmente acompanha pacientes com DMT2. O aumento na massa de triglicérides armazenados visceralmente e em depósitos subcutâneos no organismo leva a formação de adipócitos de grande porte resistentes à insulina, impossibilitando este hormônio de suprimir a lipólise. Com isso, há secreção e aumento de glicerol e ácidos graxos não esterificados circulantes no plasma, agravando a resistência à insulina nos músculos e no fígado (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

Concentrações crescentes de ácidos graxos não esterificados e citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral α (FNT α) e interleucina 6, decorrentes da expansão da camada lipídica visceral, afetam a cascata de sinalização da insulina. Nos músculos esqueléticos, os ácidos graxos não esterificados inibem o metabolismo da glicose e no fígado, estimulam a gliconeogênese. Além disso, ativam as quinases celulares incluindo as isoformas atípicas da proteína quinase C por aumentar os níveis de diacilgliceróis. Estes ativam quinases inflamatórias como o inibidor κ B quinase (IKK, *inhibitor κ B kinase*) e c-Jun N-terminal quinase e ainda,

umentam a fosforilação dos resíduos de treonina e serina de proteínas IRS regulando negativamente a cascata de sinalização.

A citocina inflamatória FNT α aumenta a lipólise nos adipócitos que, por sua vez, aumenta o nível de ácidos graxos não esterificados, enquanto que a interleucina 6 aumenta a expressão das proteínas supressoras de citocinas participantes da degradação de proteínas IRS contribuindo para a resistência à insulina (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

Enquanto o nível de ácidos graxos não esterificados está aumentando na circulação sanguínea, as concentrações de adiponectina, uma proteína adipose-específica está diminuída. A redução de adiponectina diminui a sensibilização da insulina no fígado e tecido muscular e atua, via AMP quinase, em diversas respostas metabólicas incluindo supressão da gluconeogênese hepática, captação de glicose pelo músculo esquelético durante o exercício, oxidação de ácidos graxos e inibição da lipólise, podendo explicar seus efeitos benéficos (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

A acumulação ectópica de triglicerídeos em depósitos viscerais também está associada a defeitos na oxidação lipídica mitocondrial. Pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 apresentam capacidade oxidativa comprometida e mitocôndrias pequenas nos tecido muscular esquelético. Um fator de transcrição genético, PPAR γ co-ativador 1, está envolvido na oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e síntese de ATP e encontra-se diminuído nesses pacientes, sugerindo que defeitos na fosforilação oxidativa mitocondrial podem levar a acumulação lipídica nas células (SHULMAN, 2000; STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

3.3.2 Disfunção das células β

A função das células β é regulada, principalmente, pela concentração de glicose plasmática. Porém, outras moléculas estão envolvidas como outros açúcares, aminoácidos, ácidos graxos livres, hormônios incretina, fatores de crescimento e alguns agentes farmacológicos.

A glicose é rapidamente transportada para dentro das células β pelo transportador de glicose 2 (GLUT2), onde é fosforilada pela enzima hexoquinase. Posteriormente, a glicose é transformada em piruvato e esta molécula é captada pela mitocôndria entrando no metabolismo de síntese de ATP (adenosina trifosfato). A transformação de ATP em ADP (adenosina difosfato) ativa o receptor de sulfoniluréia 1 que leva ao fechamento dos canais de potássio sensíveis a ATP resultando na despolarização da membrana e estimulando a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem. O influxo de cálcio provoca o aumento de cálcio citosólico promovendo a liberação dos grânulos de insulina (RHODES;WHITE, 2002; STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

Outra via de liberação de insulina ocorre pela ligação de agentes colinérgicos a receptores muscarínicos. Estes agentes estimulam a produção de inositol trifosfato e diacilglicerol que promovem o aumento da concentração de cálcio intracelular, que por sua vez, ativa a proteína quinase C. Os mecanismos de como ocorre o transporte dos grânulos de insulina e sua exocitose por essa via ainda não são totalmente esclarecidos (RHODES;WHITE, 2002).

A concentração de glicose plasmática também é responsável por regular a produção de pró-insulina, molécula precursora da insulina. A glicose induz o aumento na tradução de RNAm de pré-pró-insulina ao mesmo tempo que aumenta a biossíntese de enzimas conversoras de pró-insulina. O aumento dessas enzimas ocorre em paralelo à conversão de pró-insulina em insulina nas células β enquanto ocorre a adaptação da homeostase de glicose no organismo (RHODES;WHITE, 2002).

Em pacientes com DM2, a deterioração da secreção de insulina é extremamente comum ao longo dos anos variando no grau de severidade. A oxidação da glicose nas células β sempre leva a formação de espécies reativas de oxigênio que normalmente são detoxificadas pela catalase e peróxido dismutase e também, pela enzima glutatona peroxidase. Portanto, a hiperglicemia resultante do *diabetes mellitus* leva a formação de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio que danificam diversos componentes celulares das células β (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

Além da toxicidade da glicose às células β , a lipotoxicidade também deve ser considerada. Na presença de glicose, a oxidação de ácidos graxos é inibida

ocorrendo o acúmulo das cadeias longas de coenzima A. Apesar de ser um processo natural da secreção de insulina, as moléculas de coenzima A poderiam diminuir a secreção de insulina por três prováveis mecanismos: abertura dos canais de potássio das células β ; desacoplamento da proteína-2 reduzindo a formação de ATP e indução de apoptose através de ácidos graxos ou triglicerídeos ou síntese de óxido nítrico (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

O acúmulo de amilina, um polipeptídeo amilóide, que é co-secretado em uma taxa dez vezes menor que a insulina, também pode estar relacionado à disfunção das células β . Pequenos depósitos de amilina seriam citotóxicos devido à produção de radicais e são encontrados no pâncreas de alguns pacientes com DMT2, porém, há pouco conhecimento sobre a sua real função (STUMVOLL;GOLDSTEIN;VAN HAEFTEN, 2005).

Além da resistência a insulina e a disfunção das células β , as células α -pancreáticas também têm se destacado nos últimos anos. Além de deficiência na ação e/ou secreção de insulina no DMT2, há deficiência na supressão de liberação do hormônio glucagon pelas células α .

3.3.3 Disfunção das células α

As células α são reguladas por diversos hormônios e nutrientes que incluem a glicose, a insulina e hormônios do efeito incretina.

Para manter a homeostase da glicose, há um equilíbrio entre a liberação de insulina e a supressão do glucagon. O glucagon é um hormônio que apresenta efeitos contrários a ação da insulina: estimula os hepatócitos a produzirem glicose através da glicogenólise e gliconeogênese e inibe a glicólise e a glicogênese, permitindo a manutenção de níveis normoglicêmicos no período de jejum.

Como no DMT2 as células α apresentam menor sensibilização pela glicose, os níveis de glucagon estão elevados contribuindo para a hiperglicemia típica da doença (GOKE, 2008).

3.3.4 Hormônios do efeito incretina

No início do século XX, foi teorizado que hormônios intestinais estimulariam a secreção de insulina, os quais foram denominados incretinas. Os hormônios incretina mais importantes são *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) e *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (GIP). A alimentação é a principal estimulante para a liberação desses hormônios que por sua vez, modulam a liberação de insulina e glucagon nas células β e α -pancreáticas, respectivamente. Infelizmente, o tempo de meia vida desses hormônios é muito pequeno, pois, são rapidamente degradados a metabólitos inativos pela enzima dipeptidilpeptidase 4 (DPP-4) (FUJIOKA, 2007).

O hormônio GIP é um peptídeo de 42 aminoácidos produzido principalmente nas células K duodenais na porção proximal do intestino delgado. Contém uma alanina da posição 2, sendo portanto, um bom substrato para a enzima (DPP-4). O hormônio GLP-1, ao contrário, é produzido nas células enteroendócrinas L na porção distal do intestino delgado e no cólon e, ambos hormônios são rapidamente retirados de circulação pelos rins (DRUCKER, 2006).

Os receptores de GLP-1 (GLP-1R) são formados por 436 aminoácidos e expressos em diferentes órgãos como pâncreas, coração, pulmões, rins e sistema nervoso central e periférico (Figura 1). São receptores acoplados a proteína G, mas, também podem ser ativados por acoplamento ao aumento do cálcio intracelular, inibição de correntes de K^+ voltagem dependentes e ativação de genes com efeitos sobre proteína quinase C e fosfatidilinositol-3 quinase (DRUCKER, 2006).

A ativação dos GLP-1R é glicose dependente e a liberação de insulina ocorre somente quando os receptores acoplados a proteína G específico das células β são estimulados. Além da liberação de insulina, o GLP-1 atua sobre o hormônio glucagon diminuindo sua secreção agindo diretamente nas células α ou indiretamente por aumento na secreção de insulina e somatostatina (DRUCKER, 2006).

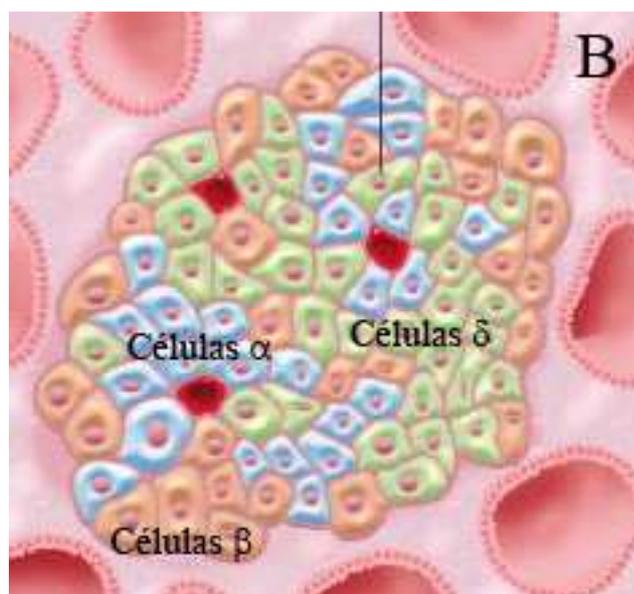
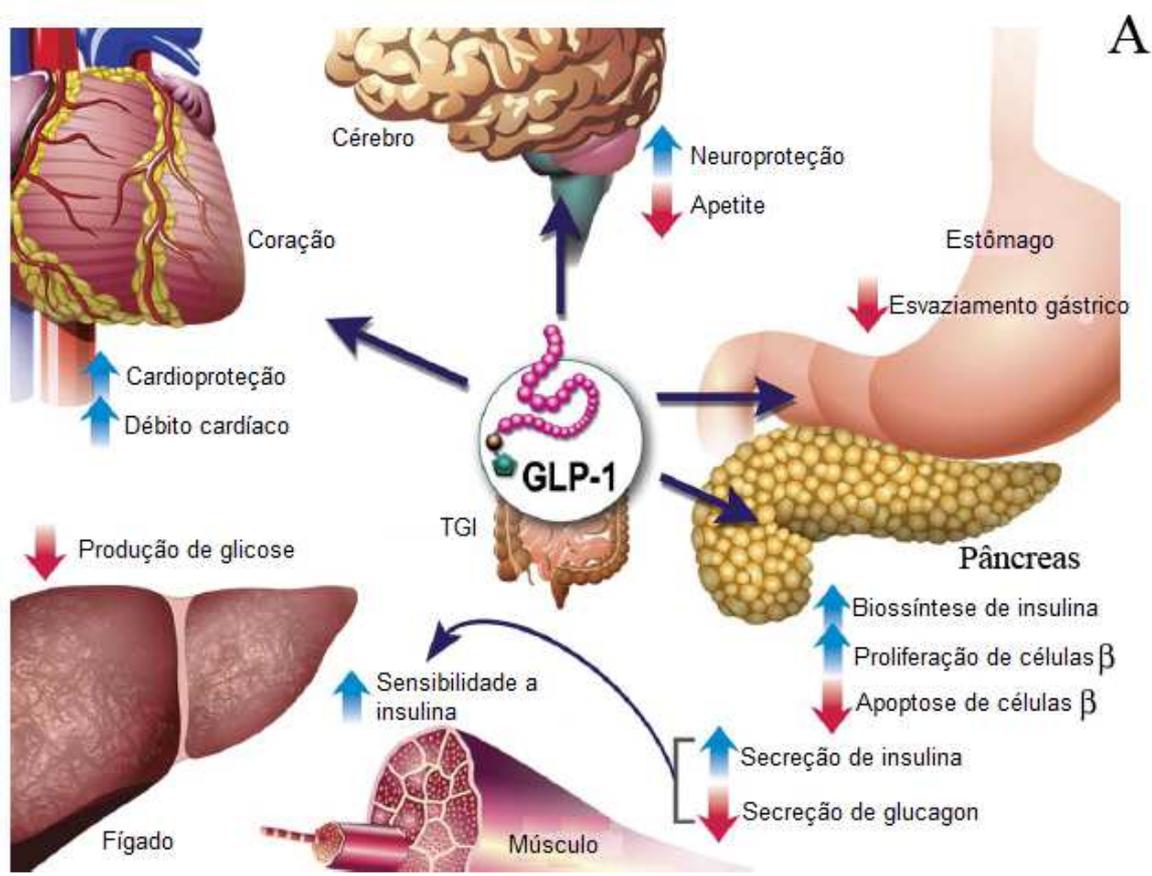


FIGURA 1 – A) AÇÕES DO HORMÔNIO INCRETINA GLP-1 EM DIFERENTES ÓRGÃOS E B) CÉLULAS PANCREÁTICAS.
 FONTE: REPRODUZIDO E ADAPTADO DE (DRUCKER, 2006).

3.4 DIAGNÓSTICO

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes e a Associação Americana de Diabetes o diagnóstico da doença é feito através de um de três critérios: o primeiro é a glicemia causal, ou seja, a glicemia medida a qualquer horário do dia e independente das refeições acima de 200 mg/dL; o segundo é glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dl e o terceiro é glicemia duas horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose acima de 200 mg/dl. A hemoglobina glicada (HbA_{1C}) também pode ser considerada como um critério de diagnóstico quando é igual ou superior a 6,5%, além disso, costuma ser o marcador principal da glicemia crônica, pois, reflete os níveis de glicose no sangue dos últimos 2 a 3 meses (ADA, 2011).

3.5 TRATAMENTO

O tratamento do DMT2 objetiva atingir níveis glicêmicos próximos a normalidade (valores inferiores a 100 mg/dl) e valores de HbA_{1C} iguais ou inferiores a 7% (SBD, 2009). O controle glicêmico é de extrema importância e já foi comprovado por estudos de longa duração da *United Kingdom Prospective Diabetes Study* que sugere que a cada 1% na redução de HbA_{1C} corresponde a redução de 37% em complicações microvasculares, 43% de amputações ou doenças vasculares periféricas, 21% de mortalidade e 14% de incidência de infarto do miocárdio (STRATTON *et al.*, 2000).

O início do tratamento do DMT2 ocorre com mudanças no estilo de vida que incluem alimentação e exercícios físicos. Porém, para a maioria dos pacientes o tratamento não-medicamentoso sozinho não é capaz de controlar a glicemia e assim, se faz necessário a introdução do tratamento medicamentoso. Este, geralmente começa com a utilização de somente um medicamento, mas devido à cronicidade da doença e progressiva disfunção das células β que conduz ao constante aumento da hiperglicemia ao longo da terapia, a associação com outros medicamentos é requerida. Estima-se que cerca de 50% dos pacientes com DMT2,

após três anos de tratamento requerem a adição de um medicamento e após 9 anos, 75% requerem utilização de múltiplas terapias para controlar os níveis glicêmicos (CEFALU;URQUHART, 2007; BLONDE, 2010).

As classes de antidiabéticos orais utilizados para o tratamento compreendem as sulfoniluréias, glinidas, tiazolineodionas ou glitazonas, inibidores de alfa-glicosidase, biguanidas e recentemente, as gliptinas.

3.5.1 Sulfoniluréias

A classe das sulfoniluréias é composta pelos fármacos clorpropamida, glibenclamida, glipizina, glicazida, e glimepirida. Estes promovem o aumento da secreção de insulina pelas células β independente dos níveis de glicose sanguíneos. Por conseqüência, a hipoglicemia é um evento adverso muito comum principalmente em pacientes idosos. As sulfoniluréias são capazes de diminuir os níveis de hemoglobina glicada entre 1 a 2% porém, outro efeito adverso comum dessa classe é aumento de peso dos pacientes em aproximadamente 2 kg após o início do tratamento (CEFALU;URQUHART, 2007; CAMPBELL, 2009).

3.5.2 Glinidas

Semelhante as sulfoniluréias, as glinidas repaglinida e nateglinida também aumentam a secreção de insulina, mas possuem tempo de meia vida menores. Por isso, as glinidas devem ser administradas mais vezes ao dia. Esta classe é capaz de reduzir a HbA_{1C} entre 0,5 a 1,5%. Os eventos adversos comuns são ganho ponderal de 0,7-1,8 kg e hipoglicemia (CEFALU;URQUHART, 2007; CAMPBELL, 2009).

3.5.3 Tiazolineodionas ou glitazonas

A rosiglitazona e pioglitazona da classe das tiazolineodionas (TZD) aumentam o desempenho da insulina endógena atuando na diminuição da insulinoresistência periférica principalmente nos músculos, adipócitos e hepatócitos. Assim, as TZD seriam capazes de preservar as células β -pancreáticas além de diminuir os níveis de HbA_{1C} entre 0,5 a 1,4%. Os efeitos adversos comuns dessa classe são ganho ponderal, retenção hídrica e aumento do risco de insuficiência cardíaca (CAMPBELL, 2009; SBD, 2009).

3.5.4 Inibidor de alfa glicosidase

O inibidor de alfa glicosidase acarbose atua no intestino delgado, diminuindo a absorção de glicose por inibir a enzima alfa glicosidase. Assim, os níveis de glicose pós-prandiais são menores e sem a ocorrência de hipoglicemia. A acarbose diminui a HbA_{1C} em 0,5 a 0,8% e não promove o ganho de peso pelos pacientes. Problemas gastrointestinais são comuns e flatulência ocorre em aproximadamente 20-30% dos usuários do medicamento o que pode diminuir a aderência do paciente ao tratamento (CEFALU;URQUHART, 2007; CAMPBELL, 2009).

3.5.5 Biguanidas

A metformina é, atualmente, a única representante comercial da classe das biguanidas e é recomendada como primeira linha de terapia após mudanças no estilo de vida (NATHAN *et al.*, 2009). Atua diminuindo a produção hepática de glicose e a glicemia de jejum por promover o aumento de sensibilidade à insulina. Adicionalmente, diminui em 1 a 2% o nível de HbA_{1C} e parece possuir ação sobre o

perfil lipídico diminuindo valores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e triacilglicerídeos e aumentando índices de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol). Embora problemas gastrointestinais sejam eventos adversos comuns da metformina, a ausência de hipoglicemia e a neutralidade ou a pequena perda de peso ponderal são vantagens importantes frente aos demais tratamentos (CEFALU;URQUHART, 2007; CAMPBELL, 2009; NATHAN *et al.*, 2009).

3.5.6 Gliptinas

As gliptinas possuem seu mecanismo de ação baseado no efeito incretina e são divididas em dois grupos: Análogos de GLP-1 e inibidores de DPP-4.

Como exemplo de análogo de GLP-1 disponível no mercado temos o fármaco exenatida. Este fármaco só é ativo quando os níveis de glicose sanguíneo aumentam como ocorre após a refeição. Desta forma, elimina-se um possível quadro de hipoglicemia (CEFALU;URQUHART, 2007). Seu inconveniente é sua forma de administração injetável que deve ser realizada duas vezes ao dia (FUJIOKA, 2007).

Outro mecanismo de ação das gliptinas é a inibição da enzima DPP-4. Dentre os fármacos dessa classe, a vildagliptina é capaz de inibir a enzima DPP-4 de forma altamente seletiva e reversível diminuindo a inativação de GIP e GLP-1, resultando em aumento do tempo de meia vida dessas incretinas. Assim, a sensibilidade das células β à glicose é aprimorada, melhorando a secreção de insulina que é dependente dos níveis de glicose sanguíneo. O mesmo acontece para as células α que passam a ser mais sensíveis aos níveis de glicose e assim, diminuem a secreção de glucagon. Portanto, a vildagliptina seria capaz tanto de diminuir a glicemia de jejum e pós-prandial quanto preservar a função das células das ilhotas de Langerhans (CROXTALL;KEAM, 2008).

Outro fator importante relacionado à vildagliptina é que esta não inibe, induz ou sofre metabolismo pelas enzimas do citocromo P450 e, portanto, não exhibe interação com outros fármacos. Isto é muito importante para os pacientes com DMT2 que normalmente recebem múltiplas medicações concomitantemente (MATHIEU,

2009). Além disso, os eventos adversos comuns de outros medicamentos como hipoglicemia e ganho ponderal não foram observados ou foram raros na terapia com vildagliptina (CROXTALL;KEAM, 2008; MATHIEU, 2009).

3.6 ASSOCIAÇÃO DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA

Os mecanismos de ação complementares de metformina e vildagliptina permitem um eficiente controle glicêmico que vem sendo demonstrado em diversos estudos.

Em dois estudos multicêntricos, randomizados, duplo cego com duração de 52 semanas e posteriormente estendido (totalizando dois anos), pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o tratamento: 50 mg de vildagliptina duas vezes ao dia (52 semanas) e 100 mg uma vez ao dia (dois anos) e glimepirida começando com 2 mg/dia, ambos administrados juntamente a metformina. Os grupos apresentaram redução de HbA_{1C} de aproximadamente 0,44% para vildagliptina e 0,53% para glimepirida após as 52 semanas de tratamento e redução de 0,1% para ambas terapias após dois anos. Porém, os casos de hipoglicemia foram 10 a 14 vezes maiores no tratamento com glimepirida para o qual também houve maior taxa de abandono da terapia devido a este evento adverso. Em relação ao peso, pacientes tratados com vildagliptina e metformina não apresentaram variação significativa enquanto que pacientes tratados com glimepirida e metformina tiveram um aumento de aproximadamente 1,2-1,6 kg. O perfil lipídico de jejum também apresentou modesta melhora no grupo com vildagliptina (FERRANNINI *et al.*, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2010).

Quando a associação de metformina e vildagliptina foi analisada em comparação à associação metformina e uma tiazolineodiona como a pioglitazona, foram observados diminuição de HbA_{1C} de aproximadamente 0,9% e 1,0% respectivamente. Estes resultados demonstram que o tratamento com a vildagliptina com a metformina não é inferior ao tratamento com pioglitazona e metformina. O ganho de peso, novamente, não foi observado com a utilização da vildagliptina. No

grupo tratado com a pioglitazona o aumento de peso foi cerca de 1,9 kg. Quanto aos níveis lipêmicos, o grupo de pacientes tratados com vildagliptina apresentou redução de 3,4 mmol/L de colesterol total, 2,3 mmol/L de LDL-colesterol e 3,7 mmol/L de não HDL-colesterol enquanto que o tratamento com pioglitazona apresentou aumento de 3,5 mmol/L, 7,9 mmol/L e 1,4 mmol/L, respectivamente (BOLLI *et al.*, 2008).

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de componentes em uma mistura. A separação é realizada através da interação dos componentes entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas como fase estacionária e um líquido eluído sob altas pressões como fase móvel. É capaz de separar e analisar quantitativamente diversos tipos de amostras, em minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS;BRAGA;BONATO, 2006).

O equipamento utilizado para a CLAE deve ser versátil, rápido, repetitivo e estável e com boa detectabilidade. Seus componentes são o reservatório para fase móvel, bombas de alta pressão, programadores de fase móvel (possibilitam a eluição por gradiente), mediadores e controladores de pressão, sistema de injeção de amostra, coluna cromatográfica e detector. Este, por sua vez, é o componente mais caro e sofisticado do sistema cromatográfico. Vários tipos de detectores podem ser usados na CLAE, entre eles, por absorvância no ultravioleta e no visível, arranjo de diodos, fluorescência, eletroquímicos, condutividade elétrica, espectrômetro de massas, entre outros (COLLINS;BRAGA;BONATO, 2006).

O acoplamento da técnica cromatográfica com a espectrometria de massas (EM) resultou em uma ferramenta analítica que apresenta vantagens de ambas as partes: eficiência de separação de compostos, alta seletividade, capacidade de analisar massa molar (na verdade a relação massa/carga, m/z) e fornecimento de informações estruturais (LIM;LORD, 2002; CHIARADIA;COLLINS;JARDIM, 2008).

A hifenção dessas técnicas só foi possível após o desenvolvimento de interfaces. Estas interfaces ou como são conhecidas, fontes de ionização, permitiram a compatibilidade entre a vazão de eluição da cromatografia, a velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e a projeção da fonte de íons. Além da fonte de ionização, o analisador e o detector também são constituintes importantes do espectrômetro de massas (GLISH;VACHET, 2003; CHIARADIA;COLLINS;JARDIM, 2008).

As fontes de ionização comumente utilizadas na cromatografia líquida são a ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) e a ionização por “*electrospray*” (*electrospray ionization*, ESI). Em ambas as fontes, a ionização ocorre à pressão atmosférica e são utilizadas altas voltagens e calor para a produção de íons que adentram o equipamento (KORFMACHER, 2005).

A fonte ESI é aplicada a compostos altamente polares ou facilmente ionizáveis em solução atingindo desde simples moléculas inorgânicas termolábeis e não voláteis até complexas moléculas biológicas (CHIARADIA;COLLINS;JARDIM, 2008; EL-ANEED;COHEN;BANOUB, 2009). Consiste na formação de um *spray* na extremidade de um capilar submetido a uma alta voltagem. A partir do *spray* são geradas pequenas gotas carregadas positiva ou negativamente, dependente da voltagem aplicada no capilar. À medida que essas gotas são dessolvatadas com auxílio de um gás nebulizador (geralmente nitrogênio), o tamanho das gotas diminui, aumentando a repulsão entre as cargas dos íons. Em um determinado momento, a força de repulsão das cargas excede a força da tensão superficial da gota, promovendo a expulsão dos íons (explosão “coulômbica”) que ficam desorvidos na fase gasosa (GLISH;VACHET, 2003; MORAES;LAGO, 2003; EL-ANEED;COHEN;BANOUB, 2009). Após essa fase de formação de íons, os mesmos são conduzidos ao analisador do espectrômetro de massas.

Os analisadores de massas se dividem em dois grupos: O primeiro grupo é composto por analisadores de transmissão, nos quais os íons provenientes da fonte de ionização atravessam o analisador como um feixe. Neste grupo encontram-se os analisadores de tempo de vôo, de setor e quadrupolo. O segundo tipo são os analisados de captura ou armadilha em que os íons ficam aprisionados até serem liberados ao detector. Pertencem a este grupo o analisador armadilha de íons (*ion*

trap) e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (GLISH;VACHET, 2003).

Os analisadores do tipo quadrupolo são amplamente utilizados em espectrômetros de massas por serem de baixo custo, facilmente automatizados e robustos. Consistem em quatro hastes dispostas em pares opostos. Em um par é aplicado um potencial de corrente direta enquanto o outro par está submetido a um potencial de radiofrequência (Figura 2). Dependendo da voltagem aplicada no quadrupolo, íons de determinada relação m/z mantêm uma trajetória estável, atravessando o analisador e chegando ao detector. Os demais íons prescrevem uma trajetória instável e eventualmente colidem com as hastes do analisador (EL-ANEED;COHEN;BANOUB, 2009).

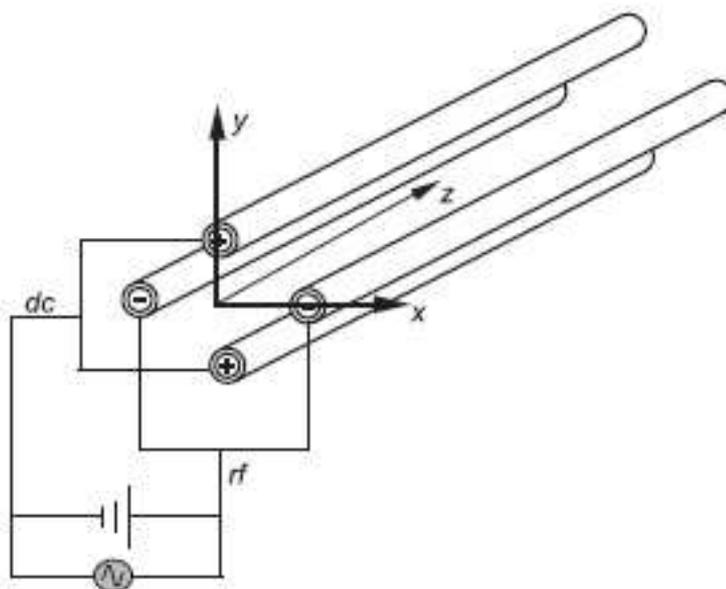


FIGURA 2: ANALISADOR DO TIPO QUADRUPOLO. DC: CORRENTE DIRETA. RF: RADIOFREQUÊNCIA.
FONTE: CHIARADIA;COLLINS;JARDIM (2008).

A técnica de EM seqüencial ou EM *Tandem* (EM-EM) é possível devido à junção de analisadores. Uma dessas junções consiste em utilizar três analisadores quadrupolos, sendo denominada triplo-quadrupolo. O primeiro e o terceiro quadrupolo são utilizados como “filtros” de massas, ou seja, selecionam uma determinada m/z . O segundo quadrupolo atua como uma câmara de colisão onde a fragmentação dos íons pode ser controlada pela voltagem e densidade do gás de colisão (DOOLEY, 2003).

3.8 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO ALIADA À QUIMIOMETRIA

A região de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e as microondas, abrangendo a faixa de 10000 a 100 cm^{-1} . Esta faixa espectral é dividida em três outras regiões que são conhecidas como infravermelho distante, de 400 a 100 cm^{-1} , infravermelho médio, de 4000 a 400 cm^{-1} e infravermelho próximo, de 13000 a 4000 cm^{-1} (STUART, 2004).

A interação de uma molécula com a radiação de IV só é possível quando o campo eletromagnético oscila na mesma frequência do momento dipolar dessa molécula, ou seja, ao absorver a radiação de infravermelho a molécula converte esta energia em vibração, gerando um espectro vibracional que costuma aparecer como bandas. Assim, a formação do espectro de IV será resultado da frequência de absorção, que depende da massa dos átomos, do arranjo geométrico dos átomos e da força de ligação entre eles (SCHARDER, 1995).

A deformação axial e a deformação angular são os tipos de vibrações moleculares observados nos espectros de IV. A deformação axial ou estiramento é um movimento rítmico ao longo do eixo de ligação em que a distância entre os átomos aumenta ou diminui enquanto que a deformação angular é um movimento em que ocorrem variações nos ângulos das ligações químicas (HOLLER;SKOOG;CROUCH, 2009).

Os espectrômetros de infravermelho médio estão comercialmente disponíveis desde os anos 40 e basicamente funcionam através de uma fonte que emite a radiação IV, que perde força à medida que passa pela amostra. Esta redução é dependente da frequência que corresponde à vibração molecular. A radiação residual é mensurada pelo detector e convertida em um espectro (STUART, 2004; HESSE;MEIER;ZEEH, 2008).

Existem dois tipos de instrumentos: os clássicos que possuem um prisma (técnica dispersiva) e os por Transformada de Fourier (FT). Os espectrômetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são atualmente os mais utilizados, pois proporcionam um espectro de melhor qualidade que é adquirido mais rapidamente (STUART, 2004).

O FTIR coleta simultaneamente os dados em todas as frequências do espectro IV e isto só é possível devido ao interferômetro. O interferômetro de Michelson converte a radiação multifrequência, que é constante com o tempo, em um interferograma que é dado não em função da frequência, mas do tempo. Posteriormente, através do processo matemático de transformação de Fourier, o interferograma é convertido em um espectro (HESSE;MEIER;ZEEH, 2008).

Os espectros de infravermelho podem ser adquiridos por meio de métodos de transmissão ou por métodos de reflectância. Os métodos de transmissão baseiam-se na absorção da radiação IV em números de ondas específicos enquanto passam pela amostra que pode ser líquida, gasosa ou sólida. Os métodos de reflectância podem ser por meio de reflexão interna como o Reflectância Total Atenuada ou por reflexão externa que pode ser especular ou difusa (STUART, 2004).

O método de reflectância difusa ou DRIFTS (do inglês, *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*) consiste na reflexão da radiação incidente sobre as partículas da superfície da amostra de forma difusa, ou seja, em múltiplas direções uma vez que a superfície da amostra é irregular. Após o espalhamento, a radiação é coletada por espelhos que a direcionam ao detector. Esta técnica é muito empregada para análises de sólidos que possam ser pulverizados, como por exemplo, os comprimidos (PARISOTTO *et al.*, 2009).

As grandes vantagens da espectroscopia de IV são a possibilidade de análises rápidas, não destrutivas, não invasivas, de baixo custo e também podem ser realizadas em tempo real tanto em produto acabado quanto na fase de processo. Além disso, a técnica tornou-se extremamente atrativa, pois não há necessidade de utilizar solventes orgânicos, não gerando resíduos e assim, podendo ser chamada de sustentável. Outro grande atrativo da técnica é a menor intervenção humana na análise, com menor manipulação da amostra, o que proporciona resultados sensíveis e exatos (PASQUINI, 2003; LIMA *et al.*, 2009; FERREIRA;BRAGA;SENA, 2012).

É possível ter uma dimensão da importância da técnica quando se analisa o exemplo do Canadá. Este país só comercializa a sua produção de trigo após a determinação de proteína no grão. Antigamente, a análise era realizada pelo método de Kjeldahl, com o qual mais de 600.000 determinações, ao ano, eram feitas. Em

1984, 80 a 90% de todos os grãos já tinham a proteína determinada por infravermelho representando uma economia de mais de US\$ 500.000, ao ano, somente com as análises (HOLLER;SKOOG;CROUCH, 2009).

O espectro de infravermelho confere a análise um grande volume de dados que precisam ser interpretados. Para este fim, uma disciplina que envolve métodos matemáticos e estatísticos tem sido aplicada com enorme sucesso na extração das informações relevantes dos espectros, conhecida por quimiometria (PASQUINI, 2003).

A quimiometria pode ser dividida em subáreas, entre elas o planejamento de experimentos, o reconhecimento de padrões e a calibração multivariada. No planejamento experimental buscam-se quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, bem como a interação entre elas (TEÓFILO;FERREIRA, 2006).

O reconhecimento de padrões é utilizado como base para análises qualitativas de classificação de amostras. É dividido em métodos de classificação não supervisionados como a análise de componentes principais (PCA) e métodos supervisionados que incluem a análise discriminante linear (LDA), k-ésimo vizinho mais próximo (KNN), SIMCA (do inglês, *Soft Independent Modelling of Class Analogy*) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) (ROGGO *et al.*, 2007).

A calibração multivariada é utilizada para análises quantitativas. Através dela é possível relacionar variáveis independentes de uma matriz X (espectros de IV) com variáveis dependentes de um bloco Y (concentração ou outra propriedade) para quantificar amostras desconhecidas. Os métodos mais conhecidos são regressão linear múltipla (MLR), regressão em componentes principais (PCR), redes neurais artificiais (ANN) e o mais comumente utilizado, PLS ou mínimos quadrados parciais (SENA *et al.*, 2000; NETO;SCARMINIO;BRUNS, 2006; SENA *et al.*, 2007).

Através do PLS é possível estabelecer um modelo de regressão linear entre os dados de uma matriz X e uma matriz Y. Para a obtenção dos modelos de calibração, essas matrizes são decompostas em uma soma de produtos de dois vetores, *scores* e *loadings*. Os *scores* representam a projeção dos valores das amostras no espaço enquanto os *loadings* são a expressão da ponderação (“peso”)

do conjunto das respostas, conhecidos como variáveis latentes (VLs) (GABRIELSSON;LINDBERG;LUNDSTEDT, 2002; BARTHUS;MAZO;POPPI, 2007).

O número de VLs utilizado para o conjunto de calibração pode ser escolhido através da validação cruzada. Com esta ferramenta quimiométrica é possível testar a capacidade preditiva do modelo. A validação cruzada do tipo “*leave one out*” consiste em tirar uma a uma, amostras do conjunto de calibração. A cada amostra retirada, um novo modelo é realizado e o resíduo (“erro”) da previsão é calculado. Ao final, tem-se a soma dos quadrados dos erros de previsão (PRESS), calculada para cada VL. O número de VL de menor PRESS é escolhido para a construção dos modelos (BRERETON, 2000).

Antes de iniciar a análise por PLS, os dados espectrais podem ser tratados com o objetivo de minimizar interferências como diferenças de espalhamento na luz, que em geral, se manifestam como variações não lineares na linha de base do espectro. Os pré-processamentos mais utilizados são centrar os dados na média, correção do espalhamento multiplicativo (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*), variação normal padrão (SNV, *Standard Normal Variate*) e derivatização e alisamento Savitzky-Golay (RINNAN;VAN DEN BERG;ENGELSEN, 2009).

Centrar os dados na média consiste em calcular a média da intensidade para cada comprimento de onda espectral e depois, subtrair esta média de todas as intensidades. Assim, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, facilitando a percepção de diferenças nas intensidades relativas das variáveis (SOUZA;POPPI, 2012).

O conceito do pré-processamento MSC baseia-se na remoção de artefatos oriundo de variância de origem física (espalhamento indesejável de luz devido a diferença no tamanho de partículas, superfície granulosa, opacidade) sejam removidos da matriz dos dados antes da etapa de modelagem. No SNV, a correção espectral corresponde a razão entre a diferença do espectro original de uma amostra com o valor médio desse espectro pelo desvio padrão de cada espectro (RINNAN;VAN DEN BERG;ENGELSEN, 2009; SOUZA;POPPI, 2012).

A derivatização tem capacidade de remover efeitos multiplicativos e aditivos nos espectros de infravermelho. A primeira derivada corrige a linha de base enquanto que a segunda derivada corrige linha de base e tendências lineares. O

alisamento Savitzky-Golay é uma etapa importante, pois auxilia na redução do ruído espectral (RINNAN;VAN DEN BERG;ENGELSEN, 2009).

3.8.1 Detecção de outliers

Outliers ou amostras anômalas são amostras muito diferentes do conjunto de dados do modelo quimiométrico e sua detecção é crucial para o bom desempenho da calibração multivariada. Essas amostras podem ocorrer devido a erros operacionais ou instrumentais, por exemplo (SILVA *et al.*, 2012).

Para as amostras do conjunto de calibração, diferentes formas podem ser utilizadas para a detecção de amostras anômalas, mas um meio bastante robusto vêm sendo amplamente aplicado que consiste na detecção de amostras com elevado *leverage*, amostras com alto valores de resíduos no bloco X e no bloco Y (VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2007; ASTM, 2012; BOTELHO;MENDES;SENA, 2012; FERREIRA;BRAGA;SENA, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

O *leverage* indica a influência de uma amostra no modelo construído. Quando a amostra influencia pouco no conjunto de calibração, tem baixo valor de *leverage*. Porém, quando uma amostra apresenta um valor de *leverage* acima de um valor limite é considerada um *outlier* e pode ser removida do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999; VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2007). Este valor limite é calculado como se segue:

$$h_{\text{limite}} = 3 \times \frac{(A + 1)}{I_{\text{cal}}} \quad (1)$$

Em que:

h_{limite} é o valor limite de *leverage*;

A é o número de variáveis latentes e;

I_{cal} é o número de amostras do conjunto de calibração.

Amostras com altos valores de resíduos em X são amostras cujos dados espectrais não foram bem modelados. Este teste é aplicado comparando-se o

desvio padrão residual total das amostras do conjunto de calibração com o desvio padrão residual de cada amostra. Se o desvio padrão residual de uma amostra for 2 vezes maior que o desvio padrão total (para um intervalo de confiança, IC, de 95%) deve ser excluída do modelo (VALDERRAMA, 2009).

Finalmente, é possível detectar *outliers* no conjunto de calibração a partir da avaliação dos resíduos em Y que são as variáveis dependentes (concentração predita). Este teste é realizado através da comparação do RMSEC (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração) do modelo com a o erro absoluto de cada amostra. Se a amostra apresentar uma diferença entre os valores de referência e os valores estimados três vezes maior que o valor de RMSEC (para IC 95%), pode ser deletada (SILVA *et al.*, 2012).

Para as amostras do conjunto de validação é possível verificar a presença de amostras anômalas através do teste de resíduos conhecido como “Jackknife” (externamente “studentizados”). Estes resíduos são distribuídos como a distribuição t com n-A-1 graus de liberdade (n é número de amostras e A é o número de VLs). Os resíduos são calculados conforme a equação (SOUZA;JUNQUEIRA, 2005):

(2)

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n - A - 1}{n - A - r_i^2}}$$

Em que:

J_{ei} são os resíduos calculados por “Jackknife”;

n é o número de amostras do conjunto de validação;

A é o número de variáveis latentes e;

r_i é o residual padronizado.

Quando uma amostra apresenta valores de J_{ei} maiores que o valor t crítico é considerada um *outlier* e deve ser excluída do modelo (SOUZA;JUNQUEIRA, 2005).

3.9 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLORIDRATO DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA

3.9.1 Metformina

A metformina é empregada em formulações farmacêuticas na forma de sal como cloridrato de metformina (Figura 3). Este é um pó cristalino, branco ou quase branco. É solúvel em água, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em acetona, éter etílico e clorofórmio (BRASIL, 2010). Na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), o doseamento de comprimidos contendo cloridrato de metformina é feito através de espectroscopia de absorção no ultravioleta. Além disso, não consta o doseamento de metformina em associação com outros fármacos e apenas a substância relacionada A (Figura 3B), é identificada no ensaio de pureza.

Na Farmacopéia America (2008) ou *United State Pharmacopoeia* (USP), o doseamento dos comprimidos é realizado através de espectroscopia de absorção no ultravioleta e análise da impureza A através de CLAE. Podem ser encontradas a análise das associações de cloridrato de metformina com glipizida ou gliburida e seus compostos relacionados, assim como os demais compostos relacionados da metformina, porém, o doseamento é feito separadamente para cada substância (USP, 2008).

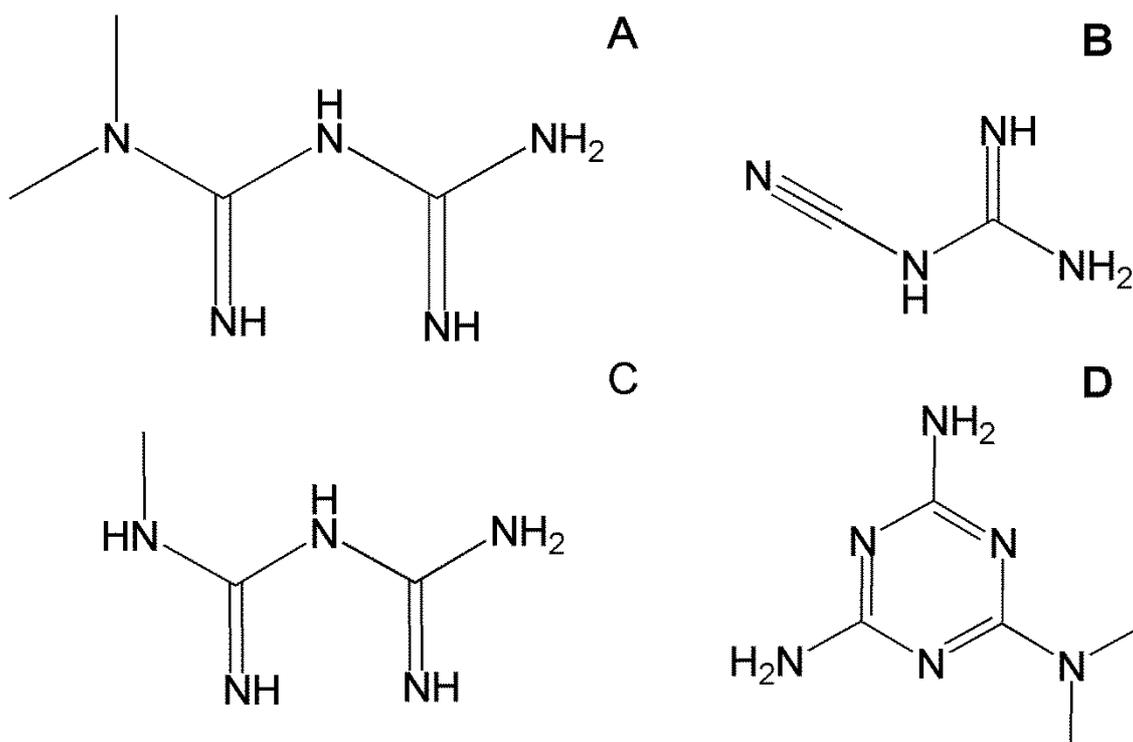


FIGURA 3 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE CLORIDRATO DE METFORMINA (A) E SUAS IMPUREZAS 1-CIANOQUANIDINA OU IMPUREZA A (B), 1-METILBIGUANIDINA OU IMPUREZA B (C) E DIMETILMELAMINA OU IMPUREZA C (D).
 FONTE: USP (2008)

Na literatura, foram encontrados métodos analíticos para formulações farmacêuticas e matrizes biológicas por CLAE com diferentes detectores (Quadro 1).

Não foram encontrados na literatura a determinação de metformina e suas substâncias relacionadas A (Figura 3B), substância relacionada B (Figura 3C) e substância relacionada C (Figura 3D).

Para o método de infravermelho próximo e calibração multivariada, foram encontrados a determinação de metformina em comprimidos (HABIB;KAMEL, 2003; PARISOTTO *et al.*, 2009).

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Medicamento e suplementos alimentares Chineses	Extração com metanol	UPLC-EM/EM ¹	Coluna: C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm) Temperatura da coluna: 40 °C Fase móvel: Solução A (acetonitrila contendo 0,1% de Ácido Fórmico) e solução B (água contendo 0,1% ácido fórmico) Fluxo: 200 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(LI <i>et al.</i> , 2010)
Produtos Herbais	Extração com metanol	CLAE-EM/EM ²	Coluna: C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: acetonitrila:solução aquosa de 0,5% de ácido fórmico 60:40, v/v Fluxo: 200 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(PANG <i>et al.</i> , 2009)
Produto final de oxidação	Geração de radicais livres por radiação gama	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 40 °C Fase móvel: tampão acetato de amônio 10 mmol/L Fluxo: 500 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(COLLIN <i>et al.</i> , 2004)
Afluente de esgoto	Extração em fase sólida	HILIC-EM/EM ³	Coluna: HILIC (150 x 3 mm; 5 µm) Fase móvel: Solução A (acetato de amônio 5 mmol/L) solução B (acetonitrila com metanol 87,5:12,5 v/v) Fluxo: 400 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(VAN NUIJS <i>et al.</i> , 2010)
Sangue Total	Extração em fase sólida com cartucho de troca catiônica fraca.	HILIC-EM/EM	Coluna: HILIC (150 x 2,1 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 30 °C Fase móvel: Solução A (água com 0,1% de ácido fórmico) Solução B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) Fluxo: 200 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(SORENSEN, 2012)

QUADRO 1– MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA (CONTINUA)

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma de rato	Precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila	HILIC-EM/EM	Coluna: HILIC (50 x 2 mm; 3 µm) Temperatura da coluna: não informado Fase móvel: acetonitrila:água 80:20, v/v, com 2 mmol/L formiato de amônio e 0,1% ácido fórmico Fluxo: 400 µL/min Fonte ionização: TurbolonSpray Modo ionização: Positivo	(ZHANG <i>et al.</i> , 2011))
Plasma Humano e plasma Animal	Precipitação de proteínas plasmáticas com metanol	LDTD-EM/EM ⁴	Fonte ionização: APCI Modo ionização: Positivo	(SWALES;GALLAGHER;PETER, 2010))
Urina Humana	Extração dos fármacos por terc-butil-metil-éster	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 (30 x 4 mm; 3 µm) Fase móvel: Solução A (ácido acético 0,1%), Solução B (acetonitrila) Fluxo: 800 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(THEVIS;GEYER;SCHANZER, 2005)
Plasma humano	Precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila	CLAE-EM/EM	Coluna: C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: acetonitrila:água:ácido fórmico (70:30:1, v/v/v) Fluxo: 500 µL/min Fonte ionização: APCI Modo ionização: Positivo	(CHEN <i>et al.</i> , 2004)
			Coluna: C18 (50 x 2,1 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 30 °C Fase móvel: acetonitrila:acetato de amônio 20 mmol/L: ácido fórmico (70:30:1 v/v/v) Fluxo: 200 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(DING <i>et al.</i> , 2007)
			Coluna: Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: acetonitrila:acetato de amônio 10 mmol/L ajustado para pH 3,5 com ácido acético (50:50 v/v) Fluxo: 1 mL/min Fonte ionização: APCI Modo ionização: Positivo	(GEORGITA <i>et al.</i> , 2007)

QUADRO 1– MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA (CONTINUA)

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma humano	Precipitação de proteínas plasmáticas com acetoneitrila	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 (100 x 2 mm; 3 µm) Temperatura da coluna: 30 °C Fase móvel: Água:acetoneitrila:ácido fórmico 55:45:0,048 v/v/% Fluxo: 300 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(MARQUES <i>et al.</i> , 2007)
			Coluna: Ciano (150 x 2 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 40 °C Fase móvel: metanol:acetato de amônia 30 mmol/L pH 5 80:20, v/v Fluxo: 200 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(ZHANG <i>et al.</i> , 2007)
			Coluna: C18 (50 x 2,1 mm; 3 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: metanol:água com 1% ácido fórmico:acetoneitrila 30:31:39, v/v/v Fluxo: 200 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(ZHONG <i>et al.</i> , 2005)
			Coluna: C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: acetoneitrila contendo 5 mmol/L de acetato de amônio em pH 3 Fluxo: 400 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(MISTRI;JANGID;SHRI VASTAV, 2007)
Plasma humano	Precipitação de proteínas plasmáticas com acetoneitrila contendo 0,1% de ácido fórmico	HILIC-EM/EM	Coluna: HILIC (150 x 2,1 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 42 °C Fase móvel: Água:acetoneitrila 30:70 v/v com 0,1% de ácido fórmico Fluxo: 650 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(LIU;COLEMAN, 2009)

QUADRO 1- MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA (CONTINUA)

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma humano	Precipitação de proteínas por diferentes solventes, dependente do método utilizado	CLAE-UV ⁵ e CLAE-EM/EM	Para CLAE-EM/EM: Coluna: Ciano (150 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: acetonitrila:acetato de amônio 10 mmol/L ajustado para pH 3,5 com ácido acético Fluxo: 1 mL/min Fonte ionização: APCI Modo ionização: Positivo	(GEORGITA <i>et al.</i> , 2010)
	Precipitação de proteínas plasmáticas com metanol:ZnS O ₄ (4:1 v/v)	CLAE-EM/EM	Coluna: Polar RP (150 x 2,0 mm; 4 µm) Temperatura da coluna: 40 °C Fase móvel: solução A (ácido fórmico 0,1% com formiato de amônio 1mmol/L) e solução B (metanol com 0,1% de ácido fórmico e 1 mmol/L de formiato de amônio) Fluxo: 200 µL/min a 400 µL/min Fonte ionização: TurbolonSpray Modo ionização: Positivo	(GONZALEZ <i>et al.</i> , 2011)
Plasma humano	Precipitação com mistura etanol: água, sob refrigeração		Coluna: Ciano (50 x 2,1 mm; 3,5 µm) Temperatura da coluna: 40 °C Fase móvel: solução A (acetonitrila:água 80:20 v/v com 1 mmol/L de acetato de amônio e 1% de ácido fórmico)e solução B (acetonitrila) Fluxo: 800 µL/min e 1 mL/min Fonte ionização: TurbolonSpray Modo ionização: Positivo	(HEINIG;BUC HELI, 2003)
	Precipitação de proteínas plasmáticas com mistura de diclorometano e álcool isoamílico		Coluna: C18 (33 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: metanol:água contendo 0,5% ácido fórmico 80:20, v/v Fluxo: 600 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(SENGUPTA <i>et al.</i> , 2009)

QUADRO 1– MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA (CONTINUA)

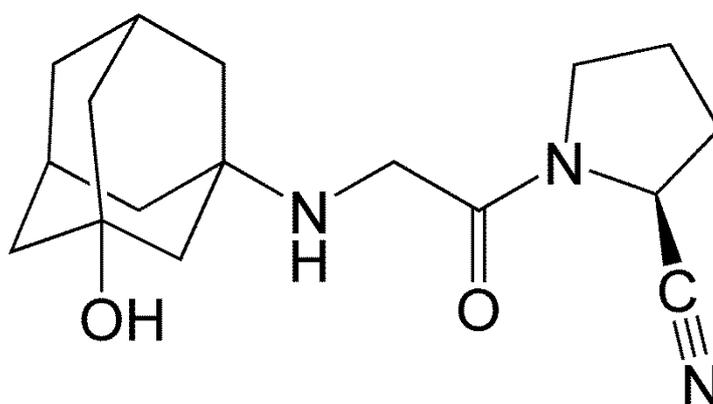
Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma humano	Precipitação de proteínas utilizando ácido acético	CLAE-EM/EM	Coluna: C18 (50 x 4,6 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: acetato de amônio 10 mmol/L pH 7: acetonitrila: metanol 60:20:20, v/v/v Fluxo: 650 µL/min Fonte ionização: APCI Modo ionização: Positivo	(WANG <i>et al.</i> , 2004)
Plasma Humano	Amostras preparadas por extração em fase sólida sem evaporação ou reconstituição	CLAE-EM/EM Fase Normal	Coluna: Troca iônica (20 x 2 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 60 °C Fase móvel: Solução A (Acetato de amônio 15 mmol/L), Solução B (acetonitrila), Solução C (acetonitrila: acetato de amônio 15 mmol/L 90:10, v/v), Solução D (metanol:água 50/50, v/v) Fluxo: 250 a 500 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(KOSEKI <i>et al.</i> , 2005)

QUADRO 1– MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE METFORMINA (CONCLUSÃO)

NOTA: 1-UPLC-EM/EM: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial; 2- CLAE-EM/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial; 3- HILIC-EM/EM: Hydrophilic interaction liquid chromatography – Cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial; 4 – LDTD: Laser diode thermal desorption acoplado à acoplada a espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial e 5- CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra-violeta.

3.9.2 Vildagliptina

A enzima dipeptidilpeptidase-4 (DDP-4) cliva a porção N-terminal de peptídeos que contenham prolina ou alanina em sua estrutura, na posição 2. Os peptídeos GLP-1 e GIP possuem alanina em sua estrutura e são substratos para essa enzima, sendo rapidamente degradados ($t_{1/2} \sim 1$ minuto). A vildagliptina é uma cianopirrolidina capaz de mimetizar a prolina. O grupo nitrilo presente no anel promove a inibição de DDP-4 em quantidades nanomolares e de uma forma reversível (Figura 4) justificando o mecanismo de ação da vildagliptina (SINGH;MANNE;PAL, 2008).



Vildagliptina

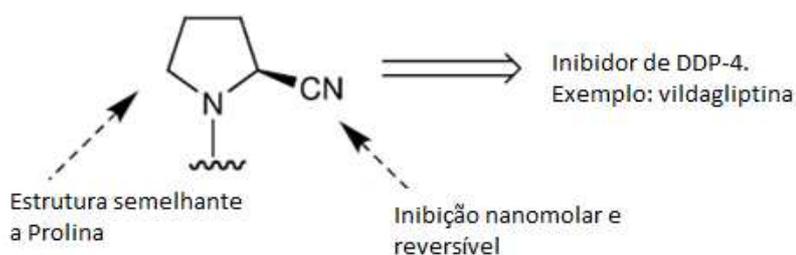


FIGURA 4 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA VILDAGLIPTINA COM DESTAQUE PARA A PARTE DA MOLÉCULA RESPONSÁVEL PELA INIBIÇÃO DA ENZIMA DDP-4
 FONTE: ADAPTADO DE SINGH; MANNE; PAL (2008)

Até o presente momento, foram encontrados três artigos contendo a quantificação da vildagliptina (Quadro 2). Um artigo descreve a quantificação da vildagliptina em plasma (HESS;MUSSHOFF;MADEA, 2011) e dois artigos em forma farmacêutica (EL-BAGARY;ELKADY;AYOUB, 2011a; 2011b). A quantificação de vildagliptina por outros métodos de quantificação, como o IV não foi encontrada na literatura.

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Plasma humano	Extração líquido-líquido com TBME	CLAE-EM/EM ¹	Coluna: C8 (150 x 2 mm; 3 µm) Temperatura da coluna: 60 °C Fase móvel: Solução A (Formiato de amônio 5mM: acetonitrila 90:10 v/v), Solução B (acetonitrila). Fluxo: 300 a 700 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(HESS;MUSHOFF;MADEA, 2011)
Comprimido e matéria-prima	Extração do fármaco dos comprimidos por metanol. Derivatização com DDQ*, TCNQ** e p-cloranil***	UV ²	Comprimentos de onda monitorados: DDQ: 486 nm TCNQ: 838 nm p-cloranil: 555 nm	(EL-BAGARY;ELKADY;AYOUB, 2011a)
Comprimido	Extração com metanol	CLAE-UV ³	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Fase móvel: Tampão fosfato pH 4,6: acetonitrila: metanol (30:50:20 v/v/v) Fluxo: 1 mL/min Detecção UV: 220 nm	(EL-BAGARY;ELKADY;AYOUB, 2011b)

QUADRO 2: MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA

NOTA: 1-CLAE-EM/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial; 2-Espectrofotometria Ultravioleta e 3-CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra-violeta. *DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, **TCNQ: 7,7,8,8-tetracianoquinodimetano e ***p-cloranil: tetracloro-1,4-benzoquinona.

3.9.3 Metformina e vildagliptina

A quantificação simultânea desses fármacos foi encontrada em análise de água e determinação em comprimidos (Quadro 3). Porém, o método apresenta algumas desvantagens como a ausência de detecção de impurezas da metformina; o comprimento de onda utilizado para a detecção dos fármacos é baixo e inespecífico (208 nm) podendo haver maior probabilidade de detecção de

interferentes; a extração é realizada com grande quantidade de metanol (100 mL) e o tempo de corrida é de 10 minutos.

Quanto a técnica de infravermelho com calibração multivariada (IV-PLS), não foi encontrado na literatura um método para determinação simultânea dos fármacos.

Tipo de amostra	Preparação da amostra	Método utilizado	Condições de análise	Referência
Água	Extração por fase sólida	CLAE-EM/EM ¹	Coluna: C18 (124 x 4 mm; 5 µm) Temperatura da coluna: 25 °C Fase móvel: Solução A (acetonitrila com 0,1% ácido fórmico), Solução B (Solução aquosa de formiato de amônio 10mM). Fluxo: 700 µL/min Fonte ionização: ESI Modo ionização: Positivo	(MARTIN <i>et al.</i> , 2012)
Comprimido	Extração com metanol	CLAE-UV ²	Coluna: Ciano (250 x 4,6 mm; 5 µm) Fase móvel: Tampão fosfato pH 4,6: acetonitrila (15:85 v/v) Fluxo: 1 mL/min Detecção UV: 208 nm	(MOHAMMAD; ELKADY; FOUAD, 2012)

QUADRO 3: MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA E METFORMINA

NOTA: 1-CLAE-EM/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas e espectrometria de massas sequencial e 2-CLAE-UV: : cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra-violeta

3.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos consiste em um processo pelo qual estudos estatísticos são utilizados com a finalidade de garantir que o método avaliado atende às exigências desejadas, comprovando que é adequado e confiável para o qual é proposto (GIL; BATISTA FILHO, 2007).

Além dos equipamentos e utensílios estarem previamente calibrados, deve-se definir os parâmetros para a validação do ensaio analítico, sendo que os mais

importantes são a exatidão, precisão, especificidade, linearidade, sensibilidade, resistência e robustez (GIL;BATISTA FILHO, 2007).

3.10.1 Validação para CLAE-EM/EM

A validação de métodos cromatográficos encontra-se descrito na RE nº 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na categoria I para análises quantitativas de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL., 2003).

3.10.1.1 Seletividade/Especificidade

É a capacidade que um método possui de avaliar de forma inequívoca uma determinada substância em uma mistura complexa (GIL;BATISTA FILHO, 2007).

Este parâmetro pode ser avaliado de diferentes formas. Uma delas é através do método de adição de padrão. Neste experimento é feito uma curva analítica com a adição do analito na amostra que depois é comparada a uma curva analítica do analito sem a presença da matriz. Se não houver interferência de um componente da matriz nos analitos, as curvas analíticas se mostrarão paralelas (RIBANI *et al.*, 2004).

3.10.1.2 Linearidade

Esse parâmetro avalia a capacidade de um método analítico demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ICH, 2005).

A correlação entre o sinal medido e a concentração do analito é expressa através de uma curva analítica. Os coeficientes da curva analítica podem ser obtidos através do método de regressão linear, o qual, gera a seguinte equação $y = ax + b$, onde y é a resposta analítica, x é concentração, a é coeficiente angular e b é o coeficiente linear).

Além dos coeficientes de regressão (a e b), pode-se obter o coeficiente de correlação “ r ”. Este é um dos parâmetros que avalia a qualidade da curva analítica, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão das amostras e a incerteza dos coeficientes de regressão calculados (RIBANI *et al.*, 2004).

Para este experimento, no mínimo cinco concentrações diferentes devem ser avaliadas para a construção da curva analítica (BRASIL., 2003).

3.10.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o LQ é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O LD para métodos como CLAE pode ser determinado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base (BRASIL., 2003; ICH, 2005).

Já o LQ pode ser determinado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base (BRASIL., 2003; ICH, 2005).

3.10.1.4 Intervalo

O intervalo é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL., 2003).

Para a determinação quantitativa do analito em formas farmacêuticas, o intervalo deve ser entre 80 a 120% da concentração teórica do teste (BRASIL., 2003).

3.10.1.5 Precisão

No ensaio de precisão, a dispersão entre resultados de análises independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões são avaliadas (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou, também como é conhecida, coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula:

$$\text{DPR ou CV (\%)} = \frac{\text{DP} \times 100}{\text{Média}} \quad (3)$$

Onde DP é o desvio padrão absoluto.

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade refere-se ao uso do método analítico dentro de mesmo laboratório em um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Também pode ser denominada de precisão intra-ensaio, intra-corrída ou intra-dia. (BRASIL., 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Pode ser verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando três concentrações (baixa, média e alta) com triplicatas ou o mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL., 2003; ICH, 2005).

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes. O objetivo deste parâmetro de validação é verificar se no mesmo

laboratório, o método fornece os mesmos resultados (BRASIL., 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A reprodutibilidade consiste na concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Refere-se aos resultados de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias (BRASIL., 2003).

3.10.1.6 Exatidão

Esse parâmetro refere-se ao grau de concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (GIL;BATISTA FILHO, 2007).

Para o ensaio de exatidão em formas farmacêuticas a metodologia empregada contempla a adição de quantidade conhecida de fármaco a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, quando não for possível, podem ser adicionados padrões ao próprio medicamento (BRASIL., 2003).

3.10.1.7 Robustez

Esse parâmetro refere-se a capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL., 2003).

Para métodos cromatográficos, a robustez pode ser avaliada através de modificações na composição e pH da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, variações na temperatura da coluna cromatográfica e também, fluxo da fase móvel (BRASIL., 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.10.2 Figuras de mérito em calibração multivariada

A validação de métodos cromatográficos e espectrofotométricos já é bem consolidada por órgãos reguladores nacionais e internacionais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), *International Conference on Harmonisation's* (ICH), entre outros. Porém, a validação desses métodos é baseada em seus dados de natureza univariados (VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2009).

As técnicas multivariadas ainda não são bem aceitas e sua implementação sofre certa resistência nas áreas farmacêuticas e médicas devido às exigências de validação. Com o intuito de auxiliar neste quesito, a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) através da E-1655-05 de 2012, fez algumas recomendações para análises com infravermelho e calibração multivariada (BRAGA;POPPI, 2004; ASTM, 2012).

Apesar das recomendações publicadas, a busca por meios de validar métodos baseados em calibração multivariada é contínua e o sinal analítico líquido (NAS, *net analyte signal*) surge como um conceito muito importante para o cálculo das figuras de mérito (BRAGA;POPPI, 2004).

O NAS pode ser definido como a parte do espectro que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra e sua representação geométrica encontra-se na figura 05 (LORBER;FABER;KOWALSKI, 1997).

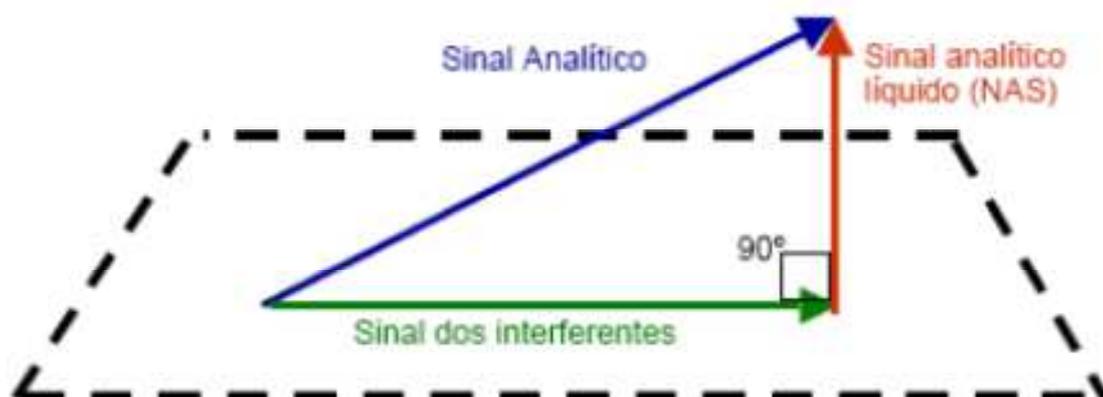


FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO VETOR DE NAS.
FONTE: (VALDERRAMA, 2005).

O vetor **NAS** pode ser relacionado com o vetor dos coeficientes de regressão, **b** de um modelo de calibração inversa multivariada, como o PLS:

$$\|\mathbf{NAS}\| = \frac{1}{\|\mathbf{b}\|} \quad (4)$$

Em que o símbolo “|| ||” indica a norma Euclidiana de um vetor.

Através do NAS é possível calcular figuras de mérito como a sensibilidade, seletividade, limite de detecção e limite de quantificação (VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2009).

3.10.2.1 Seletividade

A seletividade (SEL) corresponde ao grau de sobreposição entre o sinal do analito e o sinal dos interferentes presentes na amostra. Na calibração multivariada, a SEL é calculada pela razão entre a norma do vetor **NAS** e a norma de cada espectro. Assim, a SEL é determinada para cada amostra e o valor médio é utilizado para caracterizar o método. Como o método de infravermelho e calibração multivariada não necessitam de resolução de sinal, não é sensato estabelecer um valor limite para SEL (VALDERRAMA, 2005; FERREIRA;BRAGA;SENA, 2012).

3.10.2.2 Linearidade

Traçar uma curva de linearidade é uma problemática no universo multivariado, uma vez que as variáveis são decompostas pelas componentes principais. Qualitativamente é possível observar dois gráficos: o primeiro é o gráfico de escores *versus* concentração, sendo que este deve ser linear. O segundo é o

gráfico de resíduos das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório (BRAGA;POPPI, 2004).

A aleatoriedade dos resíduos também pode ser observada através do gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS (FERREIRA;BRAGA;SENA, 2012).

3.10.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade (SEN) corresponde à fração do sinal analítico responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (BRAGA;POPPI, 2004).

Pode ser expressa como (SENA *et al.*, 2007):

$$SEN = ||\mathbf{NAS}|| \quad (5)$$

3.10.2.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (γ), apresenta a sensibilidade do método em função da unidade de concentração que é utilizada para desenvolver o modelo. É definida como a razão entre a SEN e o ruído instrumental (ϵ) (SENA *et al.*, 2007):

$$\gamma = \frac{SEN}{||\epsilon||} \quad (6)$$

O vetor ϵ pode ser estimado a partir de 15 replicatas do branco e contém os valores de desvio padrão de seu sinal (do branco) para cada comprimento de onda (BRAGA;POPPI, 2004; SENNA *et al.*, 2007).

O inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) também é uma figura de mérito que pode ser estimada. Este parâmetro indica a menor diferença de concentração entre

as amostras que pode ser distinguida pelo método, considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erro (VALDERRAMA, 2005).

3.10.2.5 LD e LQ

Estes parâmetros apresentam a mesma definição descrita no item 3.8.1.3. Podem ser calculados como se segue (VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2007):

$$LD = 3 \frac{||\varepsilon||}{||NAS||} \quad (7)$$

$$LQ = 10 \frac{||\varepsilon||}{||NAS||} \quad (8)$$

3.10.2.6 Teste para erro sistemático (*bias*)

O erro sistemático corresponde as componentes do erro que não são aleatórias, podendo afetar outras figuras de mérito como a precisão e a exatidão (BRAGA;POPPI, 2004).

A norma da E1655-05 da ASTM (ASTM, 2012) recomenda que um teste t seja realizado para avaliar a validade do *bias*. Assim:

(9)

$$Bias = \sum_{i=1}^{nv} \frac{(y_i^{ref} - \hat{y}_i)}{nv}$$

Onde y_i^{ref} são os valores de concentração das amostras de referência, \hat{y}_i são os valores de concentração das amostras preditas e nv o número de amostras do conjunto de validação.

Para o cálculo do t ainda é necessário o cálculo do desvio padrão dos erros de validação (SDV, *standard deviation of validation errors*):

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum[(y_i^{ref} - \hat{y}_i) - bias]^2}{nv-1}} \quad (10)$$

E por final:

$$t = \frac{|bias|\sqrt{nv}}{SDV} \quad (11)$$

Se o valor de t calculado for menor que o valor de t tabelado, para o determinado v graus de liberdade (que é igual a nv) com 95% de confiança, significa que o *bias* pode ser considerado desprezível e insignificante (BRAGA;POPPI, 2004).

3.10.2.7 Precisão e exatidão

Na calibração multivariada, a precisão e a exatidão apresentam a mesma definição já detalhada nos itens 3.8.1.5 e 3.8.1.6.

Embora tenha a mesma definição, a exatidão pode ser estimada através dos parâmetros de raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, *root mean square error of prediction*), raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, *root mean square error of calibration*) e raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, *root mean square error of cross-validation*). Dentre estes parâmetros, o RMSEP é o mais robusto, pois é estimado a partir de amostras externas de validação (FERREIRA;BRAGA;SENA, 2012).

3.10.2.8 Desvio residual de previsão

O desvio residual de previsão (RPD, *residual prediction deviation*) avalia quão bem o modelo de calibração prevê o conjunto de amostras isto é, representa uma forma mais apropriada para avaliar o desempenho do modelo em termos absolutos. O RPD é variação natural das amostras de calibração e validação em relação aos prováveis erros que ocorrem durante a previsão (FERREIRA;BRAGA;SENA, 2012).

O RPD é calculado da seguinte forma:

$$RPD_{cal} = \frac{DP_{cal}}{RMSECV} \quad (12)$$

$$RPD_{val} = \frac{DP_{val}}{RMSEP} \quad (13)$$

Onde:

DP_{cal} é o desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de validação e;

DP_{val} é o desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de validação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Padrões analíticos e amostras comerciais

As informações sobre os padrões analíticos utilizados para a realização deste trabalho estão citadas no Quadro 4. Todas as substâncias relacionadas analisadas são do cloridrato de metformina e, portanto, sempre que forem citadas ao longo do texto se referirão à esse analito.

Padrão analítico	Massa molecular (g.mol⁻¹)	Teor (%)	Lote	Fabricante
Vildagliptina	303.19	98,2	110423CY	Ontario Chemicals ²
Cloridrato de Metformina	129.10	99,7	IOH236	USP ³
Substância relacionada A ¹	84.04	99	STBC0105V	Aldrich Chemistry ⁴
Substância Relacionada B ¹	115.08	100	F0F019	USP
Substância Relacionada C ¹	154.09	100	F0E343	USP

QUADRO 4: RELAÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.

Nota: ¹ Substâncias relacionadas da metformina; ²Guelph, Canadá; ³Rockville, MD, EUA e ⁴Saint Louis, MO, EUA.

As amostras comerciais de metformina foram obtidas no comércio local de Curitiba, Paraná (Quadro 5). Foram analisados o medicamento referência (R), dois medicamentos genéricos (G1 e G2) e dois medicamentos similares (S1 e S2).

As amostras que contém vildagliptina (Galvus®) e associação vildagliptina/metformina (GalvusMet ®) foram gentilmente doados pela Novartis Biociências S.A. As informações sobre estes medicamentos como teor declarado, data de fabricação, data de validade e composição estão citados no Quadro 5.

Amostra comercial	Teor declarado de fármaco (mg)		Data de fabricação (mês/ano)	Data de validade (mês/ano)
	Vil	Met		
Galvus®	50	-	11/2011	10/2013
	50	500	12/2011	05/2013
Galvus Met®	50	850	02/2012	07/2013
	50	1000	03/2012	08/2013
R	-	850	07/2012	06/2014
G1	-	850	02/2012	01/2014
G2	-	850	05/2012	05/2014
S1	-	850	06/2011	05/2014
S2	-	850	06/2012	06/2014

QUADRO 5: RELAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE ANTIDIABÉTICOS ORAIS.

Nota: Vil= vildagliptina, Met= metformina, R= medicamento referência, G = medicamento genérico e S= medicamento similar.

4.1.2 Instrumentação

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, precisão analítica de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Espectrômetro de Massas com detector triplo quadrupolo, API 3200, Applied Biosystems (Toronto, Canadá);
- Bomba de infusão Havard 22 Apparatus (South Natick, EUA);
- Gerador de nitrogênio PEAK Scientific Instruments (Chicago, EUA);

- Cromatógrafo Agilent, 1200, equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B (Wilmington, EUA);
- Injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Milford, EUA);
- Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810-R (Hamburg, Alemanha);
- Espectrômetro de infravermelho Bruker com módulos Alpha FT-IR e Alpha- T (Ettlingen, Alemanha).

4.1.3 Consumíveis

- Tubos de plástico para centrifugação de 10 mL de capacidade - Falcon Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça);
- XBridge Shield RP18 (150 x 2,1 mm; 5 µm) Waters (Milford, EUA);
- XBridge C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Waters (Milford, EUA);
- Zorbax Eclipse XDB-Phenyl (150 x 4,6 mm; 5 µm), Agilent (USA);
- Filtro de membrana Millipore Millex PVDF (polifluoruro de vinilideno) 0,22 µm de poro (Billerica, EUA).

4.1.4 Reagentes e solventes

- Acetonitrila grau CLAE, Tédia, (Fairfield, EUA);
- Metanol grau CLAE (Fairfield, EUA);
- Água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q-Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);
- Ácido fórmico 88% v/v, J. T. Baker (New Jersey, EUA).

4.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS

Foram realizados estudos de solubilidade para as substâncias cloridrato de metformina e vildagliptina. Para o cloridrato de metformina foram testados os solventes acetonitrila e metanol que não constam na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010).

Para a vildagliptina foram testados os solventes água, metanol e acetonitrila.

Para a realização do ensaio 20 mg de cada fármaco foram pesados e transferidos para tubos de ensaio de 20 mL de capacidade e alíquotas sucessivas dos solventes foram adicionados até a completa solubilização dos fármacos. O ensaio foi conduzido à temperatura ambiente e os tubos de ensaio agitados manualmente.

Os resultados da solubilidade do cloridrato de metformina e vildagliptina foram expressos de acordo com os termos descritos na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), apresentados no Quadro 6.

Para 20 mg de fármaco	
Volume solvente	Faixa de solubilidade
20 µL	Muito solúvel
20 a 200 µL	Facilmente solúvel
200 a 600 µL	Solúvel
600 a 2000 µL	Ligeiramente solúvel
2 a 20 mL	Pouco solúvel
20 a 200 mL	Muito pouco solúvel
Acima de 200 mL	Praticamente insolúvel ou insolúvel

QUADRO 6: TERMOS DESCRITIVOS PARA A DENOMINAÇÃO DA FAIXA DE SOLUBILIDADE
 FONTE: Adaptado da Farmacopéia Brasileira 5ª edição, 2010.

4.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

4.3.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de duas soluções:

Solução A: Acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

Solução B: Água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico.

Por fim, a fase móvel consistiu em mistura de 20:80 v/v da solução A e solução B.

4.3.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho

Para a obtenção da solução estoque, cada padrão analítico foi pesado quantitativamente e transferido para um balão volumétrico. O volume foi completado com metanol e a concentração final da solução foi de 1 mg/mL. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e sob refrigeração a 4 °C.

As soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição, em fase móvel, da solução estoque e preparadas conforme a necessidade do experimento a ser realizado.

4.3.3 Otimização do Espectrômetro de Massas

A checagem de sinal dos analitos foi realizada através de infusão direta no Espectrômetro de Massas com detector triplo quadrupolo equipado com bomba de

infusão e interface *electrospray* (ESI). Os dados foram processados em *software* Analyst, versão 1.4 (ABI,Sciex). Para a realização deste experimento foram preparadas soluções de trabalho, a partir da diluição das soluções estoque até a obtenção da concentração de 200 ng/mL de cada analito em mistura de acetonitrila:água 50:50 (v/v), com 0,1% de ácido fórmico.

A solução de trabalho contendo os analitos foi infundida no espectrômetro de massas através de uma bomba seringa com fluxo constante de 10 μ L/min. A fonte de ionização utilizada foi do tipo *electrospray* e o modo positivo de ionização foi escolhido com base na estrutura química dos analitos. O capilar foi mantido em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

Para realizar a otimização dos parâmetros do analisador triplo quadrupolo foi realizado o experimento de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). As concentrações dos analitos foram variadas até a obtenção de intensidade de sinal entre $2,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ cps. Após a otimização automática dos parâmetros de potencial de desagrupamento (DcIP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada da célula de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da célula (CXP) foram obtidos os dois fragmentos mais intensos de cada analito.

Em seguida, foi realizada a otimização dos parâmetros da fonte de ionização através do experimento de análise por injeção em fluxo (FIA). Nesta etapa, o cromatógrafo foi acoplado ao espectrômetro de massas e automaticamente foram otimizados os parâmetros gás de interface (CUR), gás de colisão (CAD), gás de nebulização (GS1), gás secante (GS2), voltagem do capilar (IS) e temperatura da fonte. Esta análise foi realizada com uma solução de trabalho de vildagliptina a 20 ng/mL diluída na fase móvel acetonitrila:água 50:50 (v/v), com 0,1% de ácido fórmico. O volume de amostra injetado foi de 10 μ L em fluxo de 200 μ L/min e posição de capilar 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

4.3.4 Otimização do método cromatográfico

A otimização do método cromatográfico foi realizado com diferentes colunas, entre elas C18 (150 x 2,1 mm; 5 μ m) , C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) e fenil (150 x 4,6 mm; 5 μ m).

Foram avaliadas diferentes proporções da mistura da fase móvel composta pela solução A, acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico e pela solução B, água com 0,1% de ácido fórmico. Foram testadas diferentes proporções de solventes no modo de eluição isocrático e diferentes fluxos (300 μ L/min a 800 μ L/min).

Para a realização destes experimentos foram preparadas soluções de trabalho contendo uma mistura dos analitos na concentração de 100 ng/mL para o cloridrato de metformina, vildagliptina, substância relacionada B e substância relacionada C e concentração de 400 ng/mL de substância relacionada A.

A escolha do melhor sistema cromatográfico foi baseada na maior intensidade dos picos e menor tempo de corrida. A velocidade de aquisição de dados (*dwell time*) foi calculada em função dos números de íons monitorados.

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-EM/EM

4.4.1 Seletividade

A seletividade foi determinada pelo método da adição de padrão, através da comparação de duas curvas analíticas, sendo uma obtida com soluções dos padrões de vildagliptina e metformina, e outra obtida através da fortificação de uma amostra de comprimido com a solução dos padrões.

Inicialmente, soluções padrão contendo 10, 25, 50, 75 e 100 ng/mL de vildagliptina e 170, 425, 850, 1275 e 1700 ng/mL de metformina foram preparadas em triplicata e analisadas por CLAE-EM/EM. Posteriormente, uma amostra de comprimido foi fortificada para os mesmos níveis de concentração das soluções

padrão. Para isso, dez comprimidos da associação (teor declarado de 50 mg de vildagliptina e 850 mg de metformina) foram pesados e pulverizados. Uma quantidade de pó (equivalente a 25 mg de vildagliptina e 425 mg de metformina) foi pesada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. Após a adição de 15 mL de metanol, o balão volumétrico foi submetido a 30 minutos de sonicação e 30 minutos de agitação mecânica a 50 rpm. Em seguida, o volume do balão foi completado com o mesmo diluente, homogeneizado e transferido para tubos de plástico de 10 mL de capacidade. A amostra foi centrifugada durante dez minutos a 4000 rpm e temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em filtro PVDF de 0,22 μm e o filtrado foi diluído em fase móvel de modo a obter as concentrações de 5, 12,5, 25, 37,5 e 50 ng/mL de vildagliptina e 85, 212,5, 425, 637,5 e 850 ng/mL de metformina. Por fim, para cada nível de concentração foi adicionado quantidade suficiente de solução padrão de maneira que ao final fossem obtidas as mesmas concentrações da curva analítica dos padrões.

A seletividade foi avaliada através de teste t (para um intervalo de 95% de confiança) comparando-se a média dos coeficientes angulares obtidos entre as duas curvas

4.4.2 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pela relação sinal/ruído. As soluções estoque de padrões dos fármacos e das impurezas da metformina foram inicialmente diluídas 1:10000 v/v em fase móvel. A partir dessa diluição, outras foram realizadas até obter a relação de 10 vezes o sinal/ruído para determinação do LQ e 3 vezes o sinal/ruído para determinar o LD. O ensaio foi realizado em triplicata para as concentrações que atingiram os parâmetros pretendidos.

4.4.3 Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração, em triplicata, para cada um dos fármacos. Para a vildagliptina a linearidade foi determinada na faixa de 5 a 150 ng/mL e para a metformina de 250 a 2000 ng/mL. As amostras utilizadas nesse ensaio foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque em fase móvel, conforme descrito Tabela 1.

Para cada composto uma curva de calibração foi gerada a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos *versus* a concentração dos analitos. As curvas de calibração foram construídas através do método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear 1/x para ambos os métodos. O ângulo, o intercepto e o coeficiente de correlação (r) foram calculados como parâmetros da regressão.

O intervalo de trabalho considerado para a vildagliptina foi de 80 a 120% em relação ao ponto central (50 ng/mL). Para a metformina, em virtude da dosagem dos comprimidos, o intervalo foi expandido compreendendo um valor entre 80% da concentração de 500 ng/mL a 120% da concentração de 1000 ng/mL.

TABELA 1: PREPARO DAS SOLUÇÕES DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE.

Nível de concentração	Volume solução de Vildagliptina ¹ (mL)	Volume de solução de Metformina ² (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (ng/mL)	
				Vildagliptina	Metformina
1	0,010	0,025	10,00	5	250
2	0,020	0,050	10,00	10	500
3	0,050	0,075	10,00	25	750
4	0,100	0,100	10,00	50	1000
5	0,150	0,125	10,00	75	1250
6	0,200	0,150	10,00	100	1500
7	0,300	0,200	10,00	150	2000

NOTA:¹ Solução de vildagliptina na concentração de 5000 ng/mL; ² Solução de metformina na concentração de 100000 ng/mL.

4.4.4 Precisão

O ensaio de precisão foi realizado em dois níveis: precisão intra-corrída (repetitividade) e precisão inter-corrída (intermediária).

A avaliação da repetitividade foi conduzida por um mesmo analista, no mesmo equipamento sendo realizada uma análise no período matutino e outra no vespertino. Em contrapartida, a precisão intermediária foi realizada dois dias após a repetitividade e foi conduzida por um analista diferente no mesmo equipamento.

Todos os ensaios de precisão foram realizados com as concentrações de 25, 50 e 75 ng/mL de vildagliptina e 500, 750 e 1000 ng/mL de metformina sendo todas as amostras preparadas em triplicatas.

Por fim, a precisão foi expressa em função do desvio padrão relativo entre as áreas obtidas para cada nível de concentração.

4.4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição de padrão utilizando-se três níveis de concentração para cada fármaco, em triplicata.

Inicialmente, foi elaborada uma curva de calibração para cada fármaco nas faixas de concentração de 5 a 150 ng/mL de vildagliptina e de 250 a 2000 ng/mL de metformina. Em seguida, soluções contendo 25, 50 e 75 ng/mL de vildagliptina e 500, 750 e 1000 ng/mL de metformina foram analisadas por CLAE-EM/EM conforme o método estabelecido.

A curva de calibração foi utilizada para determinar a concentração de todas as amostras analisadas.

Em uma segunda etapa foram preparadas soluções com a matriz de comprimidos. Para isto, foram pesados e pulverizados 10 comprimidos da amostra Galvus Met® na dosagem 50/850 mg e cerca de 20,44 mg do pó (quantidade equivalente a 1 mg de vildagliptina e 17 mg de metformina) foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual foram adicionados cerca

de 5 mL de metanol. O balão foi colocado em banho de ultrassom por 30 minutos e depois agitado mecanicamente a 50 rpm por mais 30 minutos. O volume do balão foi completado com o mesmo diluente e depois seu conteúdo foi transferido para um tubo de plástico de 10 mL de capacidade. As amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente por 10 minutos e a 4000 rpm. Posteriormente, os sobrenadantes foram filtrados em filtro PVDF de 22 µm. O filtrado foi diluído 1:5000 v/v em fase móvel.

A terceira etapa da exatidão consistiu em fortificar a matriz de comprimidos com os padrões de vildagliptina e metformina. Para isso, foram pesados 20,44 mg dos comprimidos pulverizados (equivalente a 1 mg de vildagliptina e 17 mg de metformina) e, em seguida, foram adicionados os padrões conforme descrito na Tabela 2. Por fim, foi realizado o mesmo procedimento da segunda etapa de modo a obter soluções com concentração final de 45, 70 e 95 ng/mL de vildagliptina e 840, 1090 e 1340 ng/mL de metformina.

TABELA 2: PREPARO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO

Composto	Nível Conc. (ng/mL)	Conc. na matriz (mg)	Quantidade adicionada à matriz (mg)	Concentração em um balão de 10 mL (mg/mL)	Concentração final em ng/mL (Diluição 1:5000 v/v)
Vildagliptina	25	1	1,25	0,225	45
	50	1	2,50	0,35	70
	75	1	3,75	0,475	95
Metformina	500	17	25,00	4,20	840
	750	17	37,50	5,45	1090
	100	17	50,00	6,70	1340

Todas as soluções obtidas foram analisadas por CLAE-EM/EM. O resultado da exatidão foi expresso pela porcentagem de recuperação conforme a fórmula:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(\text{Concentração matriz fortificada} - \text{concentração da matriz})}{\text{Concentração do padrão}} \times 100 \quad (14)$$

4.4.6 Robustez

A robustez foi avaliada, em sextuplicata, para o ponto central da curva analítica correspondendo a 50 ng/mL de vildagliptina e 1000 ng/mL para metformina.

Foram realizadas pequenas e deliberadas modificações na proporção da fase móvel, porcentagem de ácido fórmico, fluxo e temperatura da coluna (Tabela 3).

A ferramenta estatística teste t foi utilizada para avaliar o comportamento dos dados após as modificações.

TABELA 3: PARÂMETROS MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CLAE-EM/EM

Parâmetro modificado	Varição 1	Nominal	Varição 2
Acetonitrila em fase móvel (%)	18	20	22
Porcentagem ácido fórmico (%)	0,09	0,1	0,11
Fluxo da fase móvel (µL/min)	750	800	850
Temperatura do forno da coluna (°C)	23	25	27

4.4.7 Teste de estabilidade

A estabilidade foi avaliada para todos os analitos em sua solução de trabalho.

As soluções de trabalho foram preparadas à partir da diluição das soluções estoque, em fase móvel, até obter as concentrações de 250 ng/mL de metformina, 300 ng/mL de composto relacionado A e 100 ng/mL de vildagliptina e compostos relacionados B e C. O ensaio de estabilidade foi realizado em sextuplicata comparando-se as áreas obtidas de amostras recém-preparadas com aquelas amostras analisadas após 24 horas de armazenamento no gerenciador de amostras a 20 °C.

Foram consideradas estáveis as amostras com desvio padrão relativo $\leq 5\%$.

4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS VIA CLAE-EM/EM

4.5.1 Teste de extração dos fármacos da forma farmacêutica

Diferentes solventes e misturas de solventes foram testadas para extrair os fármacos dos comprimidos.

Os solventes testados foram metanol, água, fase móvel (acetonitrila:água:ácido fórmico 20:80:0,1 v/v/v) e metanol:acetonitrila 50:50 v/v.

Para este ensaio, 10 comprimidos de Galvus Met ® da dosagem 50/850 mg de vildagliptina/metformina foram pulverizados e uma quantidade de pó equivalente a 1 mg de vildagliptina e 17 mg de metformina foi pesada. Esta massa foi transferida a um balão volumétrico de 10 mL e foi adicionado o solvente extrator preenchendo cerca de 2/3 de seu volume. Em seguida, o balão volumétrico foi colocado em banho de ultrassom por 30 minutos e sob agitação mecânica a 50 rpm por mais 30 minutos à temperatura ambiente. O volume do balão volumétrico foi completado com o mesmo solvente extrator e o conteúdo do balão volumétrico foi transferido para um tubo de plástico de 10 mL de capacidade e foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, a amostra foi filtrada em filtros PVDF de 22 µm, diluída 1:10000 v/v em fase móvel e analisada por CLAE-EM/EM.

A porcentagem de recuperação dos fármacos, em cada solvente analisado, foi calculada em relação a área da solução padrão de igual concentração da amostra diluída.

4.5.2 Preparo dos comprimidos para determinação dos fármacos

A determinação dos fármacos foi realizada em sua forma farmacêutica associada (Galvus Met ®, Novartis Biociências S.A.) nas dosagens 50/500 mg,

50/850 mg e 50/1000 mg de vildagliptina e cloridrato de metformina, respectivamente. Os fármacos também foram determinados em sua forma farmacêutica não associada. Para a vildagliptina, a quantificação foi realizada em sua única forma farmacêutica disponível no mercado (Galvus[®], Novartis Biociências S.A.) na dosagem de 50 mg e para a metformina foram avaliados comprimidos do medicamento de referência, duas marcas de genéricos e duas marcas de similares, todos na dosagem de 850 mg.

O ensaio foi realizado com a pulverização de 20 comprimidos de cada amostra e uma quantidade de pó equivalente a 1 mg de vildagliptina ou 17 mg de metformina foi pesada. A massa pesada foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e cerca de 2/3 de seu volume foi preenchido com metanol. A amostra foi submetida a banho de ultrassom por 30 minutos e depois, agitação mecânica por 30 minutos. A amostra foi transferida a tubos de plástico de 10 mL de capacidade e centrifugada a 4000 rpm, por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi filtrada em filtro de 22 µm e este filtrado foi diluído 1:20000 v/v em fase móvel antes das injeções em CLAE-EM/EM.

4.6 PARÂMETROS DO MÉTODO CLAE-EM/EM PARA DETERMINAÇÃO DOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS METFORMINA E VILDAGLIPTINA

Os parâmetros cromatográficos definidos para o método foram:

- Coluna cromatográfica XBridge C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm);
- Fase móvel: mistura 20:80 v/v acetonitrila:água, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. Modo de eluição isocrático;
- Fluxo: 800 µL/min;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Temperatura da coluna: 25 °C;
- Solução de limpeza do injetor automático: Solução 1 (metanol) e solução 2 (metanol:água 50:50 v/v).

Os parâmetros otimizados para a fonte de ionização do espectrômetro de massas estão descritos no Quadro 7 enquanto que os parâmetros individuais para cada analito estão no Quadro 8.

Parâmetros da fonte	Modo positivo de ionização
Gás de interface (CUR)	10 psi
Gás de colisão (CAD)	6 psi
Voltagem do capilar (IS)	5500 V
Gás de nebulização (GS1)	45 psi
Gás secante (GS2)	40 psi
Temperatura da fonte	600°C

QUADRO 7: PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Analitos [M+H] ⁺										
	Metformina		Vildagliptina		Substância Relacionada A		Substância Relacionada B		Substância Relacionada C	
	130,05		303,9		84,9		116,0		155,2	
<i>Fragmentos mais intensos (m/z)</i>	60,1	71,1	154,1	97,1	41,2	57,1	60,1	57,1	71,1	85,1
Parâmetros										
DP (V)	21	21	21	21	46	46	26	26	36	36
EP (V)	6,5	6,5	8	8	11	11	8	8	6,5	6,5
CEP (V)	10	10	16	16	8	8	10	10	10	10
CE (V)	17	27	25	35	19	19	17	29	35	27
CXP (V)	4	4	6	4	4	4	4	4	4	4

QUADRO 8: ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DE VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS.

4.7 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IV-PLS

4.7.1 Planejamento das amostras

As amostras para os conjuntos de calibração e validação foram obtidas através de um planejamento do tipo composto central, realizado com o auxílio do software *Statistica 10.0* (StatSoft, Oklahoma, Estados Unidos).

O planejamento foi realizado a partir de quatro fatores: os fármacos vildagliptina e metformina e os excipientes. Os excipientes foram divididos em excipiente do núcleo e excipiente de revestimento.

As matérias-primas presentes no excipiente do núcleo consistiram em hidroxietilcelulose, estearato de magnésio e talco. O excipiente de revestimento foi constituído por hidroxipropilmetilcelulose, macrogol e dióxido de titânio. Esses componentes foram gentilmente doados pelo Professor Doutor Itamar Francisco Andrezza, Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

O planejamento foi elaborado a partir de um ponto central que corresponde à composição de um comprimido da associação farmacêutica (85 mg de metformina, 5 mg de vildagliptina, 8 mg de excipientes do núcleo e 4 mg de excipientes do revestimento). O planejamento foi realizado com variação de $\pm 20\%$ para os fármacos e $\pm 10\%$ para os excipientes totalizando 71 amostras.

As amostras foram separadas em dois conjuntos: conjunto das amostras de calibração composto por 46 amostras e conjunto das amostras de validação com 25 amostras.

A distribuição das amostras de calibração e validação, conforme o planejamento realizado pode ser observada na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

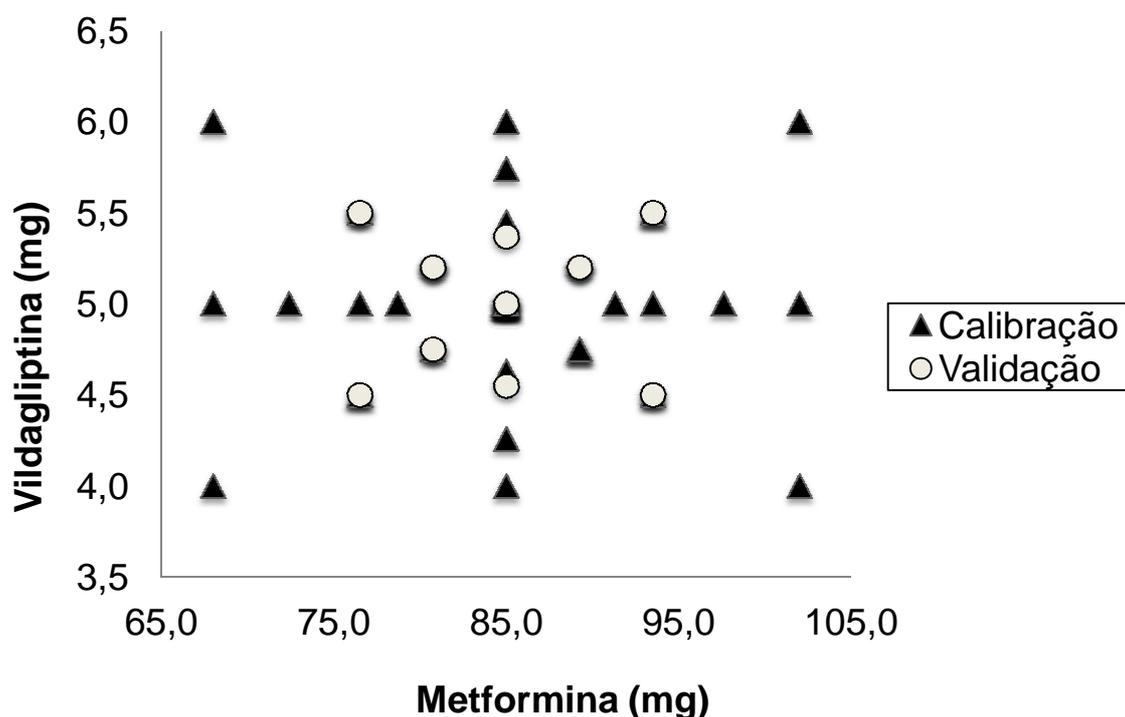


FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PLANEJAMENTO DO TIPO COMPOSTO CENTRAL DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR IV-PLS

4.7.2 Preparo das amostras e aquisição dos espectros de infravermelho

As amostras foram preparadas conforme o planejamento proposto para as amostras de calibração (Quadro 9) e para as amostras de validação (Quadro 10). Para cada amostra, uma quantidade de vildagliptina, metformina, excipiente do núcleo e excipiente do revestimento foi devidamente pesada. Em seguida, a massa pesada foi transferida e homogeneizada em gral de ágata.

Após a homogeneização, a amostra foi condicionada no aparato do módulo de refletância difusa para análise.

Os espectros de infravermelho foram adquiridos através do acessório de refletância difusa com auxílio do *software* OPUS 6.0, na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 *scans*. A aquisição foi realizada sob temperatura ($20.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$) e umidade (45-55%) controladas.

Concomitantemente, foram adquiridos espectros de infravermelho das substâncias puras de vildagliptina e metformina no modo transmitância.

Com os dados das amostras do conjunto de calibração e validação foram construídos os modelos quimiométricos através do PLS-Toolbox 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, Estados Unidos), que opera em ambiente Matlab 7.13 (The Math-Works, Natick, Estados Unidos).

Amostra	Metformina (mg)	Vildagliptina (mg)	Excipientes do núcleo (mg)	Excipientes do revestimento (mg)
1	89,25	4,75	7,60	3,80
2	85,00	5,00	8,80	4,00
3	85,00	5,45	8,00	4,00
4	76,50	4,50	7,20	3,60
5	93,50	5,50	7,20	3,60
6	76,50	5,00	8,00	4,00
7	89,25	4,75	8,40	4,20
8	89,25	4,75	8,40	3,80
9	89,25	4,75	7,60	4,20
10	80,75	4,75	8,40	3,80
11	85,00	5,00	8,00	4,00
12	85,00	5,00	7,20	4,00
13	85,00	5,00	8,00	4,40
14	93,50	5,00	8,00	4,00
15	93,50	5,50	7,20	4,40
16	85,00	6,00	8,00	4,00
17	76,50	5,50	7,20	4,40
18	93,50	4,50	8,80	4,40
19	68,00	5,00	8,00	4,00
20	93,50	4,50	8,80	3,60
21	102,00	5,00	8,00	4,00
22	85,00	5,00	9,60	4,00
23	85,00	5,00	8,00	3,20
24	93,50	5,50	8,80	3,60
25	85,00	5,00	6,40	4,00
26	76,50	4,50	8,80	4,40
27	85,00	5,00	8,00	4,80
28	85,00	5,00	8,00	4,00

QUADRO 9: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS A PARTIR DO PLANEJAMENTO (CONTINUA)

Amostra	Metformina (mg)	Vildagliptina (mg)	Excipientes do núcleo (mg)	Excipientes do revestimento (mg)
29	85,00	4,00	8,00	4,00
30	76,50	4,50	8,80	3,60
31	85,00	5,74	8,00	4,00
32	72,40	5,00	8,00	4,00
33	97,60	5,00	8,00	4,00
34	85,00	5,00	9,19	4,00
35	85,00	5,00	8,00	3,41
36	85,00	5,00	8,00	4,59
37	85,00	4,26	8,00	4,00
38	102,00	6,00	6,40	4,80
39	68,00	4,00	6,40	3,20
40	68,00	6,00	6,40	3,20
41	102,00	4,00	9,60	4,80
42	91,30	5,00	8,00	4,00
43	85,00	4,63	8,00	4,00
44	85,00	5,00	8,00	3,70
45	78,70	5,00	8,00	4,00
46	85,00	5,00	8,00	4,30

QUADRO 9: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO ELABORADAS A PARTIR DO PLANEJAMENTO (CONCLUSÃO)

Amostra	Metformina (mg)	Vildagliptina (mg)	Excipientes do núcleo (mg)	Excipientes do revestimento (mg)
1	85,00	5,00	8,00	4,00
2	85,00	5,00	8,00	3,60
3	89,25	5,20	7,60	3,80
4	80,75	5,20	8,40	3,80
5	80,75	4,75	7,60	4,20
6	80,75	4,75	8,40	4,20
7	80,75	5,20	7,60	4,20
8	80,75	4,75	7,60	3,80
9	89,25	5,20	7,60	4,20
10	89,25	5,20	8,40	4,20
11	85,00	4,55	8,00	4,00
12	80,75	5,20	8,40	4,20

QUADRO 10: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO ELABORADAS A PARTIR DO PLANEJAMENTO (CONTINUA).

Amostra	Metformina (mg)	Vildagliptina (mg)	Excipientes do núcleo (mg)	Excipientes do revestimento (mg)
13	80,75	5,20	7,60	3,80
14	89,25	5,20	8,40	3,80
15	76,50	5,50	7,20	3,60
16	76,50	5,50	8,80	3,60
17	76,50	5,50	8,80	4,40
18	93,50	4,50	7,20	4,40
19	93,50	4,50	7,20	3,60
20	76,50	4,50	7,20	4,40
21	93,50	5,50	8,80	4,40
22	85,00	5,00	6,81	4,00
23	85,00	5,37	8,00	4,00
24	85,00	5,00	8,59	4,00
25	85,00	5,00	7,41	4,00

QUADRO 10: COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO ELABORADAS A PARTIR DO PLANEJAMENTO (CONCLUSÃO).

4.7.3 Construção dos modelos de calibração multivariada

Para a construção dos modelos de calibração multivariada os parâmetros seleção de variáveis e pré-processamentos foram avaliados.

Na seleção de variáveis utilizou-se o espectro por inteiro ou regiões através do algoritmo siPLS (PLS por sinergismo de intervalo) no qual foram avaliados os intervalos de tamanho 200, 180, 100, 90 e 50 cm^{-1} .

Diferentes pré-processamentos como a primeira derivada seguida de alisamento, MSC, SNV e dados centrados na média foram testados.

A escolha do melhor modelo de calibração multivariada foi feita com base nos valores de RMSEC, RMSEP e erro médio relativo.

4.7.4 Detecção de *outliers*

4.7.4.1 Detecção de *outliers* no conjunto de calibração

A detecção de amostras anômalas do conjunto de calibração foi realizada através da avaliação do *leverage*, resíduos em Y e resíduos em X conforme descrito em item 3.8.1.

4.7.4.2 Detecção de *outliers* no conjunto de validação

A detecção de amostras anômalas no conjunto de validação foi realizada através do teste “Jackknife”.

4.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO IV-PLS

O método IV-PLS foi validado para os parâmetros de seletividade, linearidade, sensibilidade, sensibilidade analítica, limite de detecção, limite de quantificação, *bias*, RPD de calibração e validação, precisão e exatidão.

4.8.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pelos gráficos de valores de referência *versus* valores preditos através do coeficiente de regressão “r” e também pela constatação da aleatoriedade dos resíduos.

4.8.2 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-dia e intermediária. Para ambas, foram analisadas amostras em três níveis de concentração, em triplicata. A concentração baixa utilizada foi o ponto de planejamento com variação -10% para ambos os fármacos (4,5 mg para vildagliptina e 76,50 mg para metformina), a concentração média utilizada foi o ponto central do planejamento e a concentração alta foi o ponto do planejamento com variação de +10% para os fármacos (5,5 mg de vildagliptina e 93,5 mg de metformina).

Para avaliar a repetitividade, as amostras foram preparadas e os espectros foram adquiridos em um curto período de tempo, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento.

Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram preparadas e os espectros adquiridos em dias e analistas diferentes e no mesmo equipamento.

A precisão foi avaliada em função do desvio padrão relativo.

4.9 DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM AMOSTRAS REAIS

Para realizar este ensaio, 20 comprimidos do medicamento Galvus Met® de dosagem 50/850 mg da associação farmacêutica (Quadro 5) foram pesados individualmente para o cálculo do peso médio e, em seguida foram pulverizados. Da massa total, foram pesadas 10 amostras de pó equivalentes a 5 mg de vildagliptina e 85 mg de metformina.

As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um gral e pistilo de ágata e transferidas para um aparato para aquisição dos dados em modo DRIFTS. Como o método de infravermelho não é destrutivo, as mesmas amostras também foram analisadas por CLAE-EM/EM conforme descrito no item 4.5.2.

Após a aquisição dos espectros de infravermelho, as amostras foram quantificadas no modelo de PLS. Os teores obtidos por IV-PLS e CLAE-EM/EM foram comparados estatisticamente pelo teste t (intervalo de confiança de 95%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DE SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS

O estudo de solubilidade dos fármacos cloridrato de metformina e vildagliptina foi avaliado a fim de verificar quais dos solventes (metanol, acetonitrila e água) seriam capazes de dissolver completamente as substâncias. Essa informação foi necessária para a obtenção das soluções estoque e de trabalho bem como para os experimentos de MRM, FIA e cromatografia.

Os resultados de solubilidade dos fármacos encontram-se na Tabela 4. Os termos descritivos foram denominados de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5^ª edição.

TABELA 4: DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS FÁRMACOS CLORIDRATO DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA.

Solventes	Fármacos	
	Cloridrato de metformina	Vildagliptina
Água	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel
Acetonitrila	Insolúvel	Solúvel
Metanol	Ligeiramente solúvel	Facilmente solúvel

Como observado, os fármacos apresentaram boa solubilidade nos solventes testados, exceto o cloridrato de metformina que se mostrou insolúvel em acetonitrila.

A partir desses resultados foi possível trabalhar com misturas de solventes que solubilizassem ambos os fármacos.

5.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

5.2.1 Otimização dos parâmetros do analisador e fonte de ionização do espectrômetro de massas

O primeiro experimento realizado foi a otimização dos parâmetros do analisador triplo quadrupolo através do MRM. Para atingir a intensidade de sinal necessária para realizar esse experimento, foram preparadas individualmente solução de trabalho na concentração de 50 ng/mL para os analitos cloridrato de metformina, vildagliptina, substância relacionada B e C e na concentração de 200 ng/mL para a substância A.

Os parâmetros DcIP, EP, CEP, CE e CXP foram automaticamente ajustados pelo equipamento e ao final, foram obtidos dois íons fragmentos mais intensos para cada analito (Quadro 11). Desses íons fragmentos selecionados, o mais intenso foi utilizado para a quantificação e o menos intenso, para a qualificação/confirmação do fármaco analisado.

Analitos [M+H] ⁺										
	Metformina		Vildagliptina		Substância Relacionada A		Substância Relacionada B		Substância Relacionada C	
	130,05		303,9		84,9		116,0		155,2	
<i>Fragmentos mais intensos (m/z)</i>	60,1	71,1	154,1	97,1	41,2	57,1	60,1	57,1	71,1	85,1
Parâmetros										
DcIP (V)	21	21	21	21	46	46	26	26	36	36
EP (V)	6,5	6,5	8	8	11	11	8	8	6,5	6,5
CEP (V)	10	10	16	16	8	8	10	10	10	10
CE (V)	17	27	25	35	19	19	17	29	35	27
CXP (V)	4	4	6	4	4	4	4	4	4	4

QUADRO 11: PARÂMETROS OTIMIZADOS PELO EXPERIMENTO DE MRM PARA A OBTENÇÃO DOS ÍONS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS.

Após o ajuste dos parâmetros pelo MRM, foram otimizados os parâmetros da fonte de ionização pelo FIA. Este experimento foi realizado com uma solução de vildagliptina 20 ng/mL em acetonitrila:água 50:50, v/v, com 0,1% de ácido fórmico e os resultados podem ser observados no Quadro 12.

Parâmetros da fonte	Modo positivo de ionização
Gás de interface (CUR)	10 psi
Gás de colisão (CAD)	6 psi
Voltagem do capilar (IS)	5500 V
Gás de nebulização (GS1)	45 psi
Gás secante (GS2)	40 psi
Temperatura da fonte	600°C

QUADRO 12: PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO, EM MODO POSITIVO, OTIMIZADOS PELO EXPERIMENTO FIA.

5.2.2 Otimização do método cromatográfico

Para o início do desenvolvimento cromatográfico foi realizado um levantamento na literatura das colunas mais utilizadas para análise de metformina e vildagliptina. A coluna do tipo octadecilsilano (C18) foi empregada por diversos autores e assim, foi escolhida como ponto de partida para os experimentos (COLLIN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; THEVIS;GEYER;SCHANZER, 2005; ZHONG *et al.*, 2005; DING *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2007; MISTRI;JANGID;SHRIVASTAV, 2007; PANG *et al.*, 2009; SENGUPTA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010).

Os experimentos foram conduzidos com fluxo de 300 µL/min em modo isocrático. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água 10:90, v/v, ambos os solventes com 0,1% de ácido fórmico. Também foi realizado um experimento sem a adição de ácido fórmico para avaliar a sua influência na ionização das moléculas. Como pode ser observado na Figura 7A, a fase móvel sem adição de ácido fórmico apresentou um perfil cromatográfico insatisfatório para todos os analitos, principalmente para a impureza A da metformina que não sofre ionização e por isso, não é observada no cromatograma. Um aumento na intensidade de sinal foi

observado com a adição de 0,1% de ácido fórmico, no entanto isso não contribuiu para melhora no perfil cromatográfico da vildagliptina (Figura 7B).

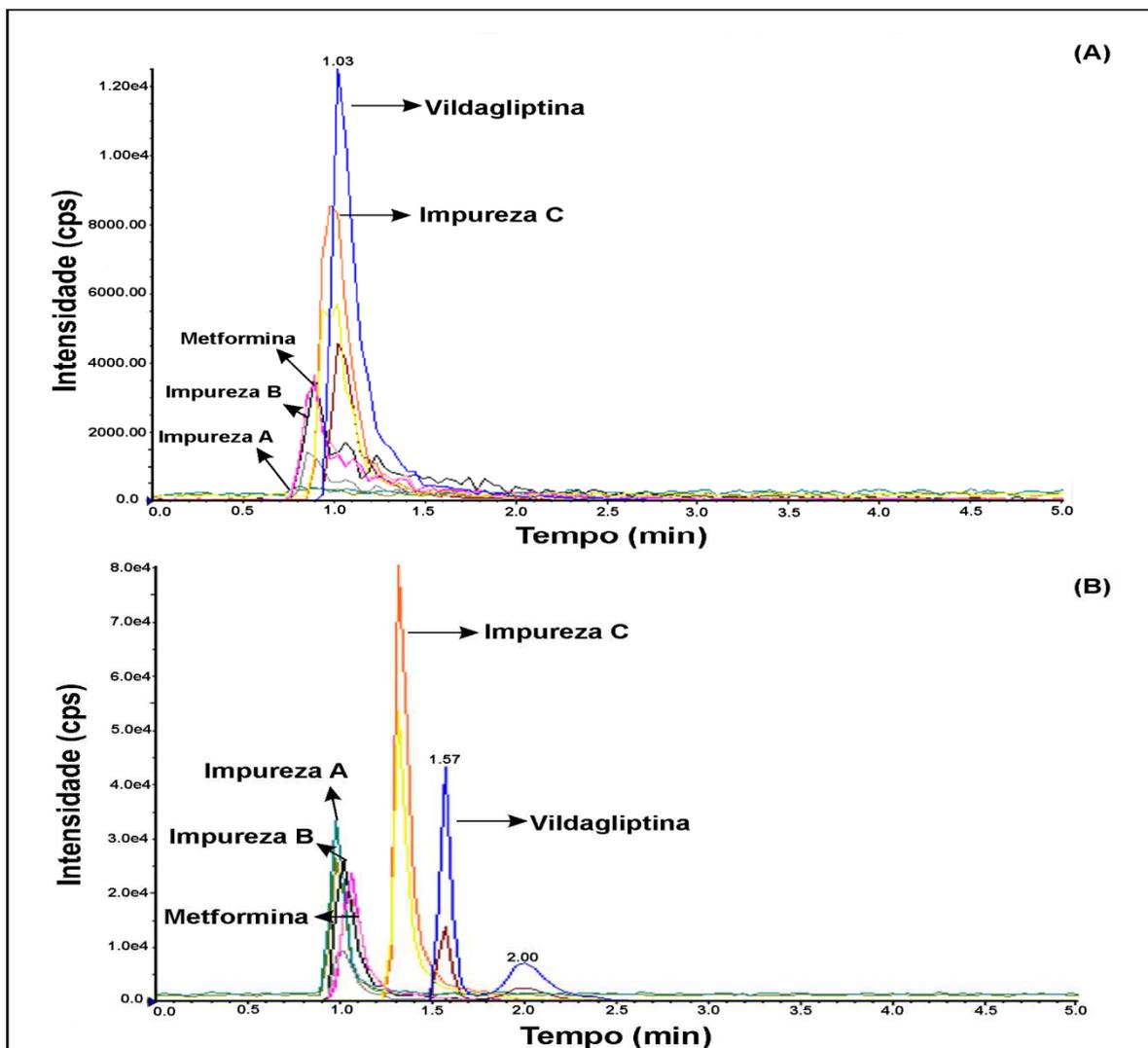


FIGURA 7- CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA C18, FLUXO 300 μ L/MIN, FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 10:90, V/V. A) SEM ADIÇÃO DE ÁCIDO FÓRMICO E B) COM ADIÇÃO DE 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.

Foi avaliada, ainda, a troca do solvente acetonitrila por metanol para a composição da fase móvel visando observar melhora no perfil cromatográfico dos analitos. Contudo, com essa modificação, tanto o composto relacionado C e quanto a vildagliptina não apresentaram um bom perfil cromatográfico (Figura 8). Logo, optou-se por trabalhar com a fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada com ácido fórmico.

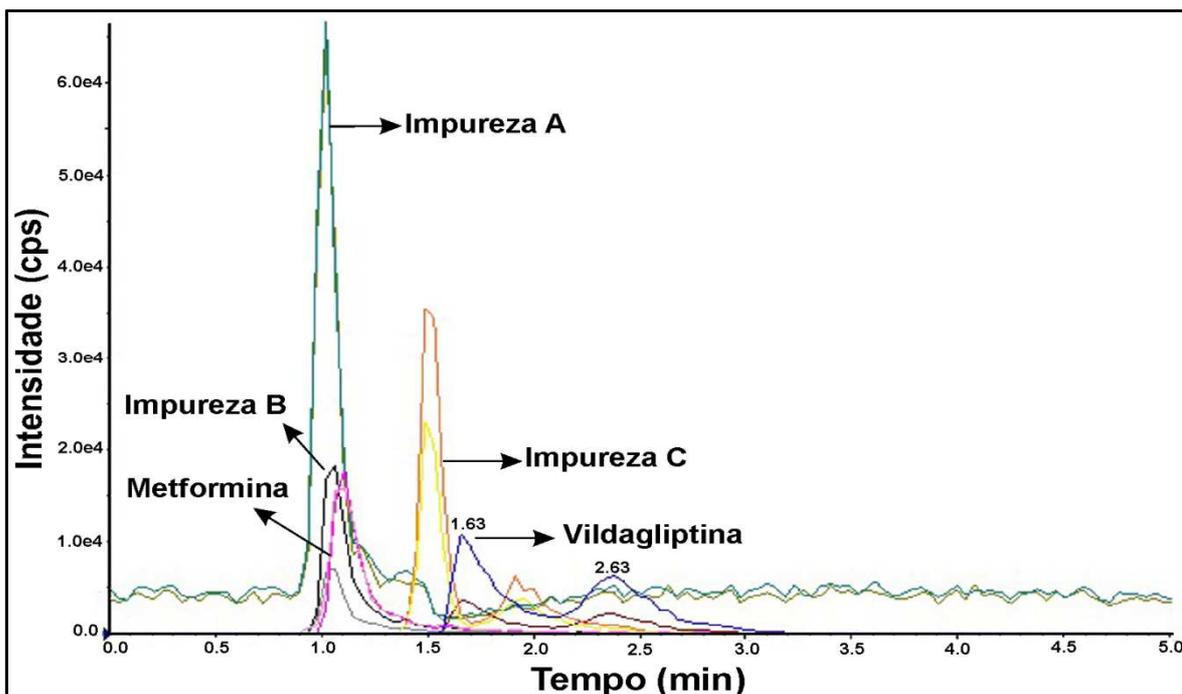


FIGURA 8- CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA C18, FLUXO 300 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ E FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA 10:90, V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.

Além do fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, foi testado para a coluna C18 o fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Com isso, foi observada pequena diminuição no tempo de retenção dos compostos, porém, não houve melhoria no perfil cromatográfico da vildagliptina (resultado não ilustrado). Com base nos resultados apresentados, essa coluna foi desconsiderada para o desenvolvimento deste trabalho.

Em seguida, foi realizado um experimento com uma coluna do tipo fenil. A fase estacionária fenil permite interações entre as ligações π dos grupos fenil da coluna com as ligações π dos analitos. Assim, espera-se uma melhora cromatográfica para os analitos, uma vez que esses possuem em sua estrutura química este tipo de ligação. Para o teste, foi utilizado a fase móvel composta por acetonitrila:água (10:90 v/v), com 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Com a utilização da coluna houve melhora no perfil cromatográfico da vildagliptina, dos compostos relacionados A e B e da metformina. Porém, observa-se que o composto relacionado C não apresentou um bom perfil cromatográfico e a vildagliptina permaneceu retida por aproximadamente 13 minutos (Figura 9). Desta forma, a coluna fenil também não foi desconsiderada para o desenvolvimento do método.

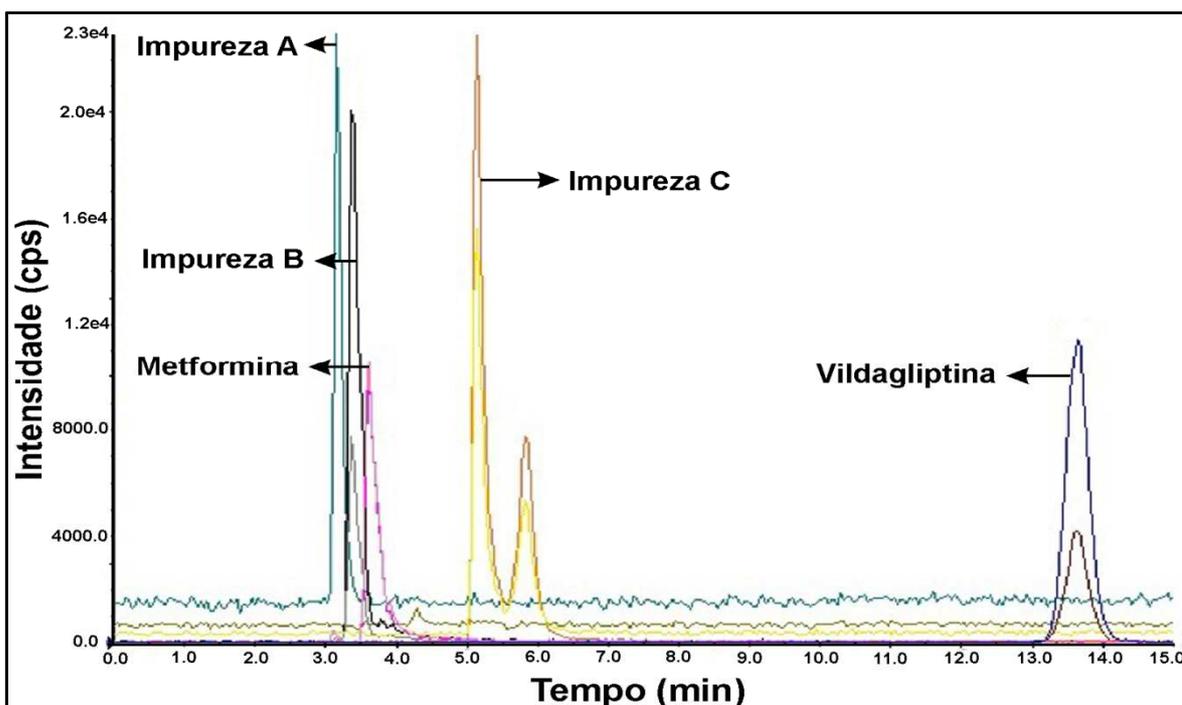


FIGURA 9: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA FENIL, FLUXO 400 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ E FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 10:90 V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.

A próxima coluna utilizada foi do tipo C8. Por ser uma coluna de maior polaridade que a coluna C18, espera-se que os compostos mais polares como a metformina e suas impurezas apresentem uma melhor interação com a mesma. O primeiro experimento realizado foi conduzido com as mesmas condições de fluxo e fase móvel da coluna fenil.

Conforme observado na Figura 10, somente a metformina e seus compostos relacionados A e B apresentaram um bom perfil cromatográfico. Comparado aos demais analitos, a vildagliptina permaneceu muito tempo retida (aproximadamente 11 minutos).

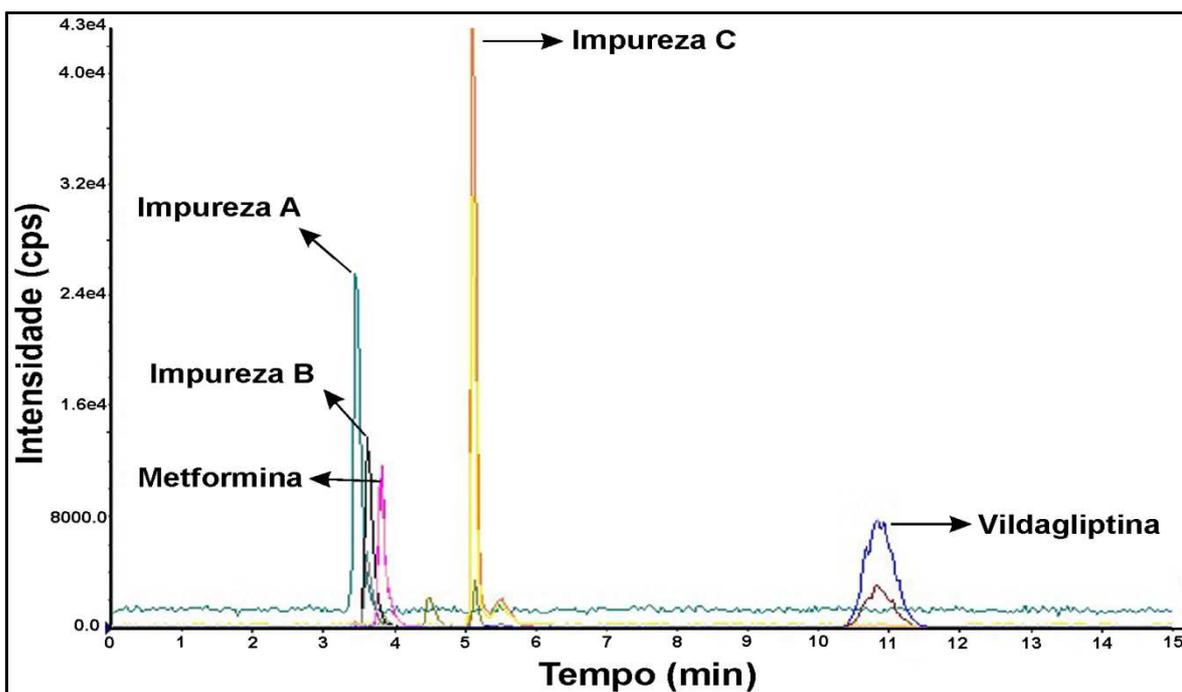


FIGURA 10: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS COM COLUNA C8, FLUXO 400 $\mu\text{L}/\text{MIN}$ E FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 10:90, V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO.

Para diminuir o tempo de retenção da vildagliptina e melhorar o perfil cromatográfico do composto relacionado C, o fluxo foi modificado de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ para 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Com essa modificação, apesar de reduzir o tempo de retenção da vildagliptina para 5,4 minutos, o perfil cromatográfico do composto relacionado C permaneceu insatisfatório e novos experimentos foram realizados a partir da modificação da proporção dos solventes da fase móvel.

A quantidade de solvente orgânico acetonitrila foi alterada de 10% para 15%, 20% e 25% e o fluxo mantido em 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Com 10% de acetonitrila, a vildagliptina apresentou um tempo de retenção de 5,4 minutos (Figura 11A). Quando a proporção de acetonitrila passou para 15% e 20%, os tempos de retenção obtidos foram de 3,3 e 2,6 minutos, respectivamente (Figura 11B e Figura 11C). Além disso, com 20% de acetonitrila foi observada uma melhora no perfil cromatográfico da impureza C. No entanto, quando testada a proporção de 25% de acetonitrila, o perfil cromatográfico da vildagliptina apresentou comprometimento (Figura 11D). Portanto, a fase móvel acetonitrila:água 20:80, v/v, com 0,1% de ácido fórmico e a coluna C8 foram selecionadas para a continuidade deste trabalho.

Com a proporção da fase móvel definida, foram realizados experimentos com diferentes fluxos variando de 400 a 800 $\mu\text{L}/\text{min}$, visando observar sua influência

sobre os tempos de retenção dos analitos, tempo total de corrida cromatográfica e perfil cromatográfico. Para todos os analitos o tempo de retenção diminuiu com o aumento do fluxo sem prejudicar os perfis cromatográficos e, portanto, o fluxo de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ foi escolhido viabilizando uma corrida cromatográfica com tempo total de 3,5 minutos (Figura 12).

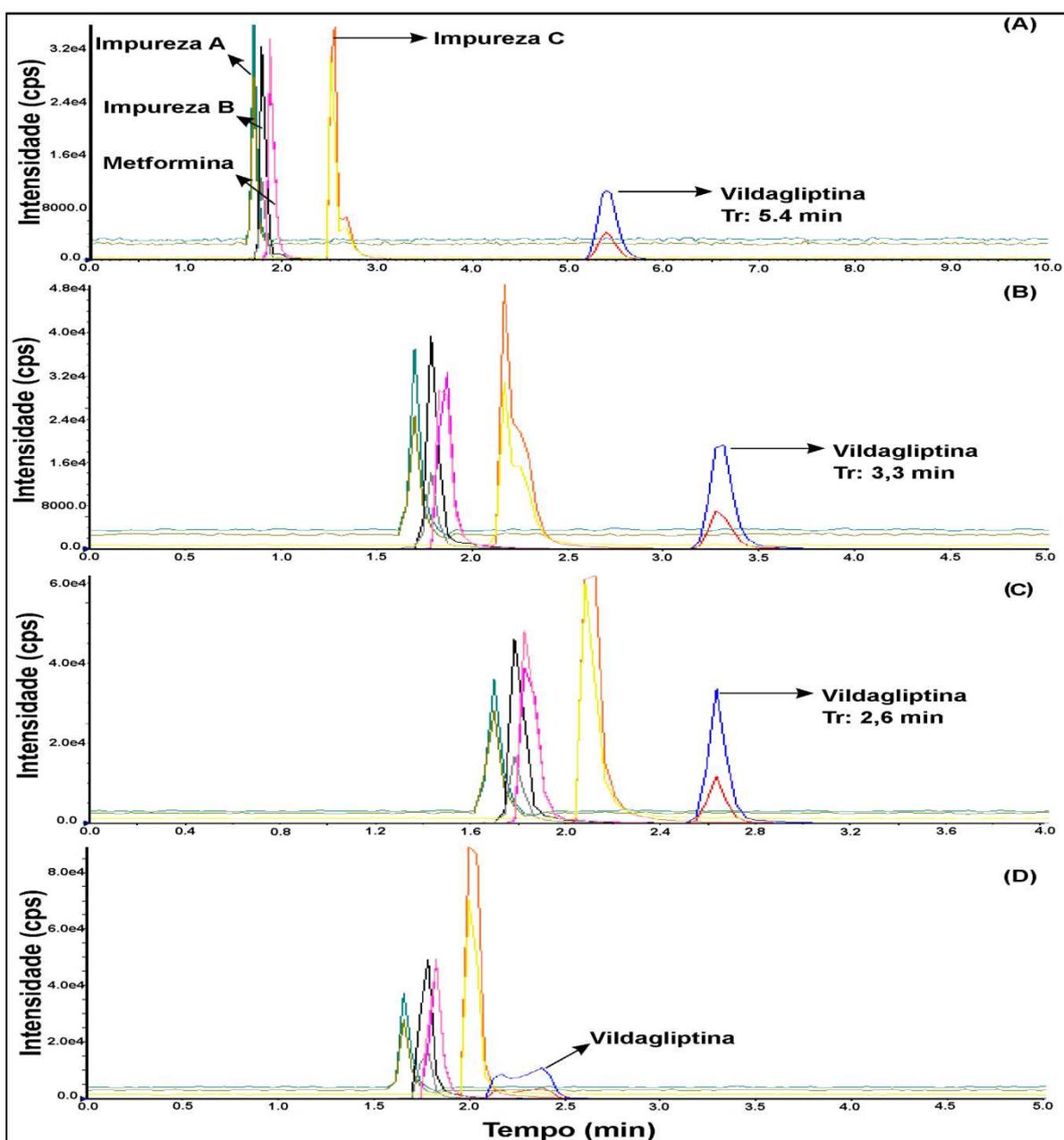


FIGURA 11: CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES PROPORÇÕES DE ACETONITRILA NA FASE MÓVEL. A) 10% DE ACETONITRILA; B) 15%; C) 20% E D) 25%.

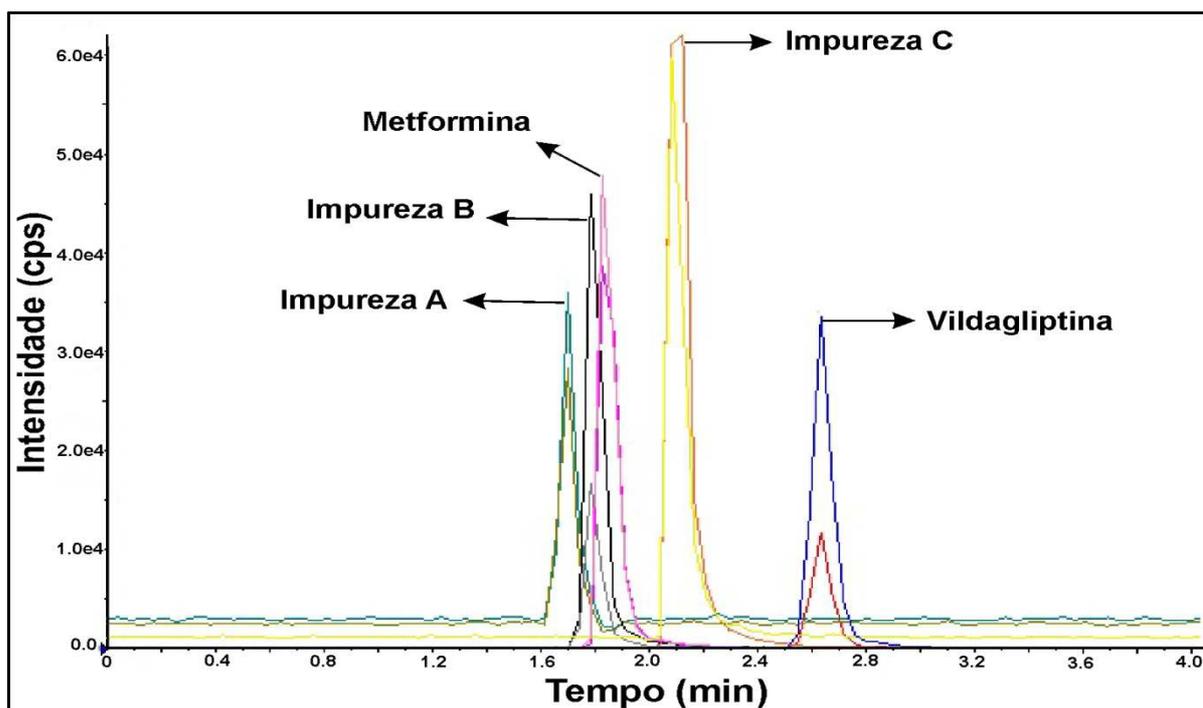


FIGURA 12: CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE VILDALGIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDO A PARTIR DA FASE MÓVEL ACETONITRILA:ÁGUA 20:80, V/V, COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO E FLUXO 800 μ L/MIN. TEMPO TOTAL DE CORRIDA 3,5 MINUTOS.

Embora a simetria dos picos cromatográficos e o tempo de corrida observados até o momento fossem satisfatórios, avaliou-se ainda uma possível influência da temperatura da coluna na cromatografia dos analitos. Foram realizados testes a 25, 30, 35 e 40 °C. Não foram observadas grandes variações na intensidade dos picos dos analitos e a vildagliptina apresentou mudanças de seu perfil cromatográfico (Figura 13). Assim, a temperatura de 25 °C foi escolhida para o desenvolvimento do método. A velocidade de aquisição dos dados (*dwell time*) foi de 250 ms para os íons monitorados.

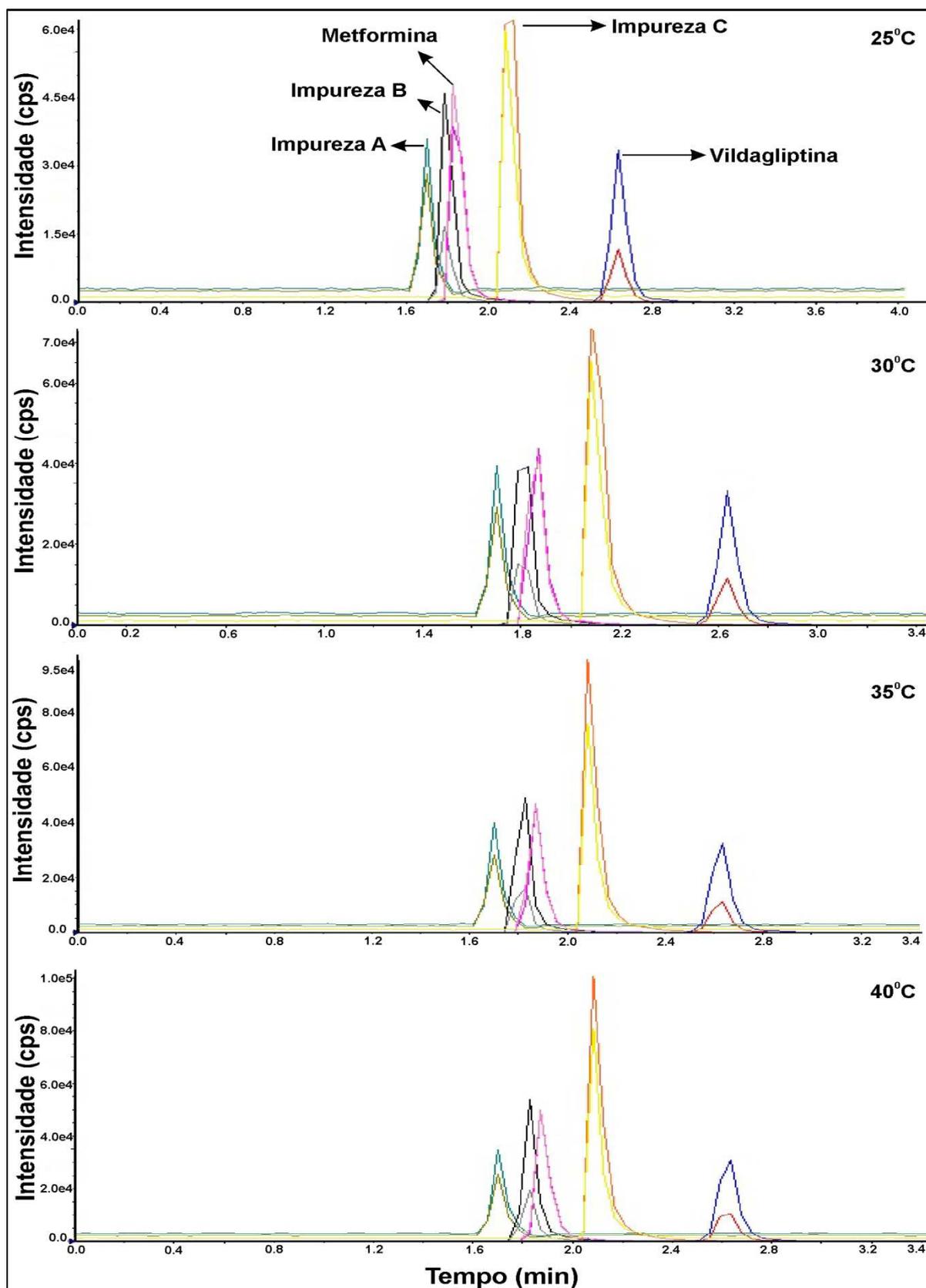


FIGURA 13- CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE VILDAGLIPTINA, METFORMINA E SUAS IMPUREZAS OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TEMPERATURAS DA COLUNA.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

5.3.1 Seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado através da comparação dos coeficientes angulares obtidos das curvas analíticas preparadas em solução padrão e aquelas obtidas da matriz de comprimidos fortificada.

Como pode ser observado na Tabela 5, o método desenvolvido é seletivo, pois os coeficientes angulares de ambas as curvas analíticas são estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

TABELA 5: COEFICIENTES ANGULARES PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE EM CLAE-EM/EM.

Analito	Equações de regressão		Valor de p*
	Solução padrão	Matriz fortificada	
Vildagliptina	$y = 8,66 \cdot 10^3 - 6,69 \cdot 10^3$ $y = 8,56 \cdot 10^3 + 278$ $y = 8,5 \cdot 10^3 + 3,94 \cdot 10^3$	$y = 8,8 \cdot 10^3 - 3,42 \cdot 10^3$ $y = 8,37 \cdot 10^3 - 8,71 \cdot 10^3$ $y = 8,01 \cdot 10^3 + 478$	0,483
Metformina	$y = 1,95 \cdot 10^3 + 1,44 \cdot 10^6$ $y = 2,19 \cdot 10^3 + 1,33 \cdot 10^6$ $y = 2,01 \cdot 10^3 + 1,51 \cdot 10^6$	$y = 2,12 \cdot 10^3 + 1,76 \cdot 10^6$ $y = 2,08 \cdot 10^3 + 1,85 \cdot 10^6$ $y = 2,14 \cdot 10^3 + 1,76 \cdot 10^6$	0,442

NOTA: n = 3, * = intervalo de 95% para o test t de Student.

5.3.2 Limites de detecção e quantificação

LD e LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído conforme descrito no item 4.4.2.

Valores muito baixos de LD e LQ foram obtidos (Tabela 6), indicando que a sensibilidade do método é excelente, principalmente para a detecção de impurezas da metformina.

TABELA 6: LD E LQ DOS ANALITOS PELO MÉTODO DE CLAE-EM/EM.

Analito	LD Concentração (ng/mL)	LQ Concentração (ng/mL)
Vildagliptina	0,005	0,5
Metformina	0,005	0,2
Composto relacionado A	1,5	2,5
Composto relacionado B	0,1	0,5
Composto relacionado C	0,1	0,25

5.3.3 Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração (ver item 4.4.3), variando entre 5 a 150 ng/mL para a vildagliptina e 250 a 2000 ng/mL para metformina. A linearidade não foi determinada para os compostos relacionados da metformina, pois o limite máximo estabelecido para essas substâncias é muito próximo dos seus limites de quantificação (BRASIL, 2010). Por isso, os ensaios realizados para estes compostos foram apenas qualitativos (presença ou ausência da substância).

A linearidade foi obtida através da análise de regressão $1/x$, calculada pelo método dos quadrados mínimos, através do *software Analyst 1.4.2*.

Para avaliar a qualidade da curva de calibração, foram estimados a precisão e a exatidão dos níveis de concentração para ambos os analitos. A precisão apresentou valores de DPR menores que 6% enquanto que a exatidão variou entre 92 e 108% (Tabela 7). Esses resultados foram considerados satisfatórios tendo em vista que variações de até 15% são aceitáveis para métodos que utilizarem espectrometria de massas. Além disso, os coeficientes de regressão (r) apresentaram valores maiores que 0,99, indicando uma boa correlação linear entre as concentrações e cumprindo as exigências dos órgãos reguladores (Figura 14 e Figura 15).

TABELA 7: VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA.

Analito	Nível de concentração esperado (ng/mL)	Nível de concentração determinado (ng/mL)	Precisão (DPR%)	Exatidão (%)
Vildagliptina	5	4,78	2,62	95,57
	10	9,98	5,70	99,77
	25	25,7	2,80	102,53
	50	49,93	2,01	99,83
	75	77,27	1,72	103,00
	100	102,70	3,37	102,70
	150	144,67	1,06	96,57
Metformina	250	238,67	2,42	95,40
	500	537,33	0,47	107,33
	750	783,00	1,53	104,33
	1000	1036,67	0,56	103,67
	1250	1246,67	2,58	99,17
	1500	1473,33	1,41	98,07
	2000	1836,67	1,26	91,80

O intervalo de trabalho foi estabelecido a partir do ponto central da vildagliptina, na faixa de 80% a 120% compreendendo as concentrações de 40, 50 e 60 ng/mL. Para a metformina, o intervalo foi expandido em relação à concentração teste (1000 ng/mL) devido à grande variação de dosagem do fármaco que pode ser encontrado em sua forma farmacêutica (de 500 mg a 1000 mg). Assim, a faixa de trabalho compreendeu entre 80% da concentração de 500 ng/mL e 120% da concentração de 1000 ng/mL. As concentrações de trabalho foram 400 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL e 1200 ng/mL.

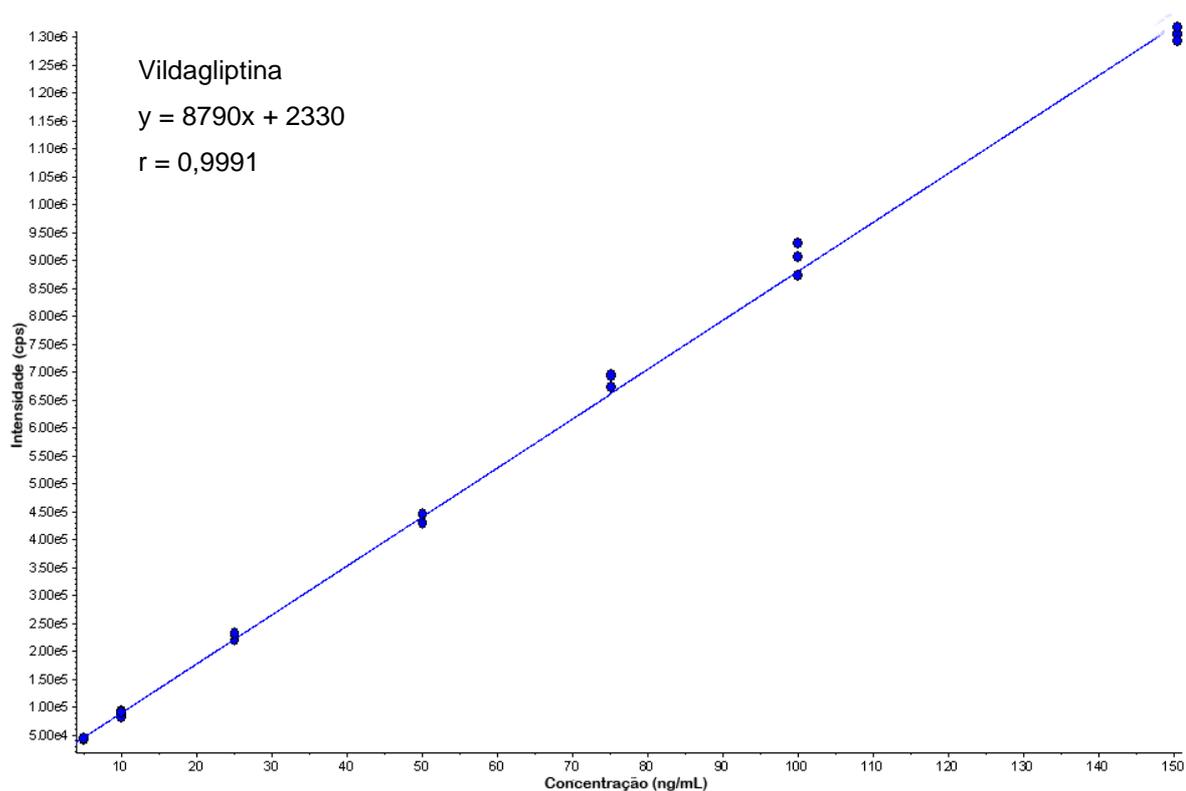


FIGURA 14: LINEARIDADE DA VILDAGLIPTINA OBTIDA POR CLAE-EM/EM.

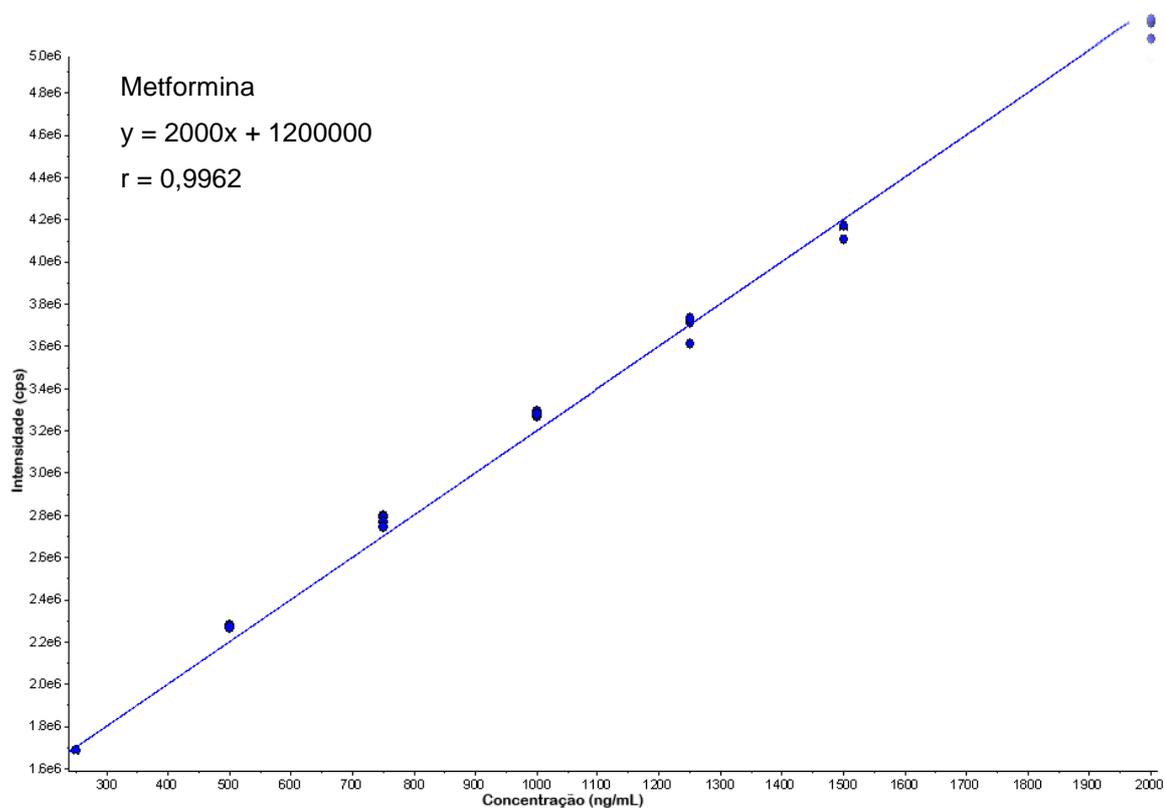


FIGURA 15: LINEARIDADE DA METFORMINA OBTIDA POR CLAE-EM/EM.

5.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis, repetitividade e precisão intermediária, nas concentrações de 25, 50 e 75 ng/mL para a vildagliptina e 500, 750 e 1000 ng/mL para a metformina conforme item 4.4.4.

Os resultados de precisão encontram-se dispostos na Tabela 8. Como pode ser observado, para ambos analitos os valores de DPR da repetitividade e da precisão intermediária foram menores que 5% indicando que o método é preciso de acordo com a regulação vigente (BRASIL., 2003).

TABELA 8: RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO PARA A VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CLAE-EM/EM

Repetitividade				
Analito	Concentração (ng/mL)	Determinação 1 (Área média ± DP)	Determinação 2 (Área média ± DP)	DPR (%)
Vildagliptina	25	165333,33 ± 6429,10	161666,67 ± 3214,55	1,59
	50	436666,67 ± 29263,17	414333,33 ± 11239,81	3,71
	75	599000,00 ± 11532,56	608666,67 ± 16802,78	1,13
Metformina	500	2736666,67 ± 23094,01	2563333,33 ± 122202,02	4,63
	750	3383333,33 ± 68068,59	3193333,33 ± 70237,69	0,59
	1000	3956666,67 ± 40414,51	3800000,00 ± 10000	2,86
Precisão intermediária				
Analito	Concentração (ng/mL)	Determinação 1 (Área média ± DP)	Determinação 2 (Área média ± DP)	DPR (%)
Vildagliptina	25	161666,67 ± 3214,55	154000,00 ± 1732,05	3,43
	50	414333,33 ± 11239,81	387000,00 ± 2645,75	4,82
	75	608666,67 ± 16802,78	572333,33 ± 9291,57	4,35
Metformina	500	2563333,33 ± 122202,02	2727500,00 ± 59090,33	4,39
	750	3193333,33 ± 70237,69	3375000,00 ± 12909,94	3,91
	1000	3800000,00 ± 10000	4015000,00 ± 98149,54	3,89

5.3.5 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado pelo método de adição do padrão. A exatidão foi expressa como a porcentagem recuperada de fármaco da matriz de comprimidos fortificada. Os valores de exatidão foram considerados satisfatórios com recuperação variando entre 99 e 108%, como mostrado na Tabela 9 e, portanto, o método desenvolvido foi considerado exato.

TABELA 9: RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CALE-EM/EM.

Analito	Nível de Conc. (ng/mL)	Conc do padrão em ng/mL (média ± DP)	Conc da matriz em ng/mL (média ± DP)	Conc da matriz fortificada em ng/mL (média ± DP)	Conc recuperada em ng/mL	Recuperação (% ± DP)
Vildagliptina	25	23,73 ± 0,38		45,10 ± 0,17	25,77	108,56 ± 0,94
	50	49,57 ± 0,57	19,33 ± 0,49	69,97 ± 0,83	50,63	102,17 ± 3,16
	75	73,90 ± 0,62		94,87 ± 2,54	75,53	102,20 ± 2,97
Metformina	500	503 ± 5,29		843,67 ± 10,07	508,00	101,01 ± 3,20
	750	750,33 ± 4,93	335,67 ± 4,93	1090,00 ± 10,00	754,33	100,54 ± 2,20
	1000	1002,33 ± 6,81		1336,67 ± 20,82	1001,00	99,86 ± 1,17

5.3.6 Robustez

A robustez foi avaliada em sextuplicata a partir de pequenas modificações do método original.

Como pode ser observado na Tabela 10, pequenas modificações de teor de acetonitrila na fase móvel não provocam alteração na exatidão dos resultados exceto para a metformina, cuja determinação demonstrou ser sensível a menor porcentagem de solvente orgânico ($p = 2,15 \times 10^{-6}$).

Variações de fluxo, temperatura da coluna e porcentagem de ácido fórmico foram observados como pontos críticos do método (todos os parâmetros apresentaram valores de p inferiores a 0,05), ou seja, pequenas modificações desses itens comprometem a exatidão da análise.

Apesar dos resultados, o ensaio de robustez não visa invalidar um método e sim, apontar os fatores que devem ser cuidadosamente operados pelos analistas.

TABELA 10: RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CLAE-EM/EM (CONTINUA).

Parâmetros cromatográficos	Compostos			
	Vildagliptina		Metformina	
	Área \pm DP	Valor de p	Área \pm DP	Valor de p
<i>Fase móvel</i>				
Nominal 20% acetonitrila	42016,67 \pm 1506,54	-	3347300,00 \pm 51283,53	-
18%	40016,67 \pm 2590,30	0.13	2878966,67 \pm 106895,59	2.15^{-6}
22%	40700,00 \pm 4865,39	0.54	3255633,33 \pm 99532,24	0.07
<i>Fluxo</i>				
Nominal 800 μ L/min	42016,67 \pm 1506,54	-	3347300,00 \pm 51283,53	-
750 μ L/min	3418,33 \pm 304,99	3.14^{-14}	3152300,00 \pm 95289,03	0.0013
850 μ L/min	32566,67 \pm 1664,53	1.20^{-6}	2808966,67 \pm 68896,06	2.79^{-8}

TABELA10: RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA POR CLAE-EM/EM (CONCLUSÃO).

Parâmetros cromatográficos	Compostos			
	Vildagliptina		Metformina	
	Área ± DP	Valor de p	Área ± DP	Valor de p
<i>Temperatura da coluna</i>				
Nominal 25°C	42016,67 ± 1506,54	-	3347300,00 ± 51283,53	-
23 °C	34250,00 ± 1162,33	1.59 ⁻⁶	2755633,33 ± 38297,08	6.36 ⁻¹⁰
27 °C	34833,33 ± 2041,24	4.02 ⁻⁵	2860633,33 ± 61779,18	3.86 ⁻⁸
<i>% ácido fórmico</i>				
Nominal 0.1%	42016,67 ± 1506,54	-	3347300,00 ± 51283,53	-
0.09%	25382,18 ± 1951,41	1.37 ⁻⁸	2346000,00 ± 80415,59	9.28 ⁻¹⁰
0.11%	24882,18 ± 477,49	1.32 ⁻¹⁰	2474333,33 ± 39370,04	1.01 ⁻¹⁰

5.4 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Para as soluções de trabalho, somente o composto relacionado A se mostrou estável após 24h quando armazenado no gerenciador de amostra, em fase móvel, a uma temperatura de aproximadamente 20°C (Tabela 11). Por este motivo, recomenda-se que as amostras sejam analisadas, o mais breve possível, após o preparo.

TABELA 11: RESULTADOS DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Analito	Conc. (ng/mL)	Tempo	Área nominal (tempo 0h)	Temperatura do gerenciador de amostras (20°C)	
				Área ± DP	DPR (%)
Vil	100	24h	373666,67 ± 8687,16	334500,00 ± 21407,94	7,82
Met	250	24h	1401666,67 ± 16020,82	1300000,00 ± 21908,90	5,32
CRA	300	24h	108166,67 ± 2786,87	106000,00 ± 7483,31	1,43
CRB	100	24h	558000,00 ± 16456,00	593000,00 ± 21577,77	9,62
CRC	100	24h	948333,33 ± 20742,87	858833,33 ± 12335,59	9,40

NOTA: VIL = VILDAGLIPTINA; MET = METFORMINA; CRA = COMPOSTO RELACIONADO A; CRB = COMPOSTO RELACIONADO B E CRC = COMPOSTO RELACIONADO C.

5.5 DETERMINAÇÃO, VIA CLAE-EM/EM, DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM COMPRIMIDOS

5.5.1 Teste de extração dos fármacos

Os solventes extratores utilizados para este teste foram metanol, água, a fase móvel (preparada conforme item 4.3.1) e uma mistura acetonitrila:metanol 50:50 v/v.

A água e a mistura acetonitrila:metanol proporcionaram uma extração de 86% e 88% para a vildagliptina e 88% e 90% para a metformina, respectivamente. A fase móvel apresentou cerca de 92% de extração dos fármacos dos comprimidos.

Estes valores foram considerados baixos e insatisfatórios para o objetivo proposto e portanto, estes solventes extratores foram desconsiderados.

Dentre todos os solventes testados, o metanol foi o que apresentou melhores resultados com extração superior a 99% para ambos os fármacos e assim, foi escolhido como solventes para a extração de vildagliptina e metformina dos comprimidos.

5.5.2 Quantificação dos fármacos antidiabéticos nas amostras comerciais

Os fármacos vildagliptina e metformina foram determinados simultaneamente em sua forma farmacêutica comprimido, comercializada como Galvus Met[®] (Novartis Biociências S.A.) em três dosagens diferentes.

Embora o método de análise tenha sido inicialmente desenvolvido para quantificar os fármacos associados, o mesmo foi utilizado para os comprimidos que continham os fármacos isolados. Desta forma, foi possível avaliar se o método é aplicável a mais de um tipo de medicamento. Para isto, o método foi aplicado ao fármaco vildagliptina, comercializado como Galvus[®] (Novartis Biociência S.A.) na dosagem de 50 mg. O método também foi aplicado a comprimidos de metformina, porém de diferentes fabricantes. Foram analisados o medicamento de referência (R), dois medicamentos genéricos (G1 e G2) e dois medicamentos similares (S1 e S2) todos na dosagem de 850 mg de metformina.

Como pode ser observado na Tabela 12, foram encontrados teores de metformina variando entre 98 e 104%. Os teores encontrados estão de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5^a edição, que descreve uma variação de $\pm 5\%$ (BRASIL, 2010).

Para o fármaco vildagliptina, foram encontrados teores variando entre 95 e 102%. Este fármaco não se encontra descrito em farmacopéias e por isso, não possui uma faixa específica de variação de teor indicada. Porém, a variação encontrada pode ser considerada satisfatória.

TABELA 12: RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS ANTIDIABÉTICOS ORAIS EM COMPRIMIDOS POR CLAE-EM/EM

Amostra	Teor declarado (mg)		Teor encontrado \pm DP (mg)		Teor (%)	
	Vil	Met	Vil	Met	Vil	Met
Galvus®	50	-	47,60 \pm 2,08	-	95,2	-
Galvus Met®	50	500	50,60 \pm 2,19	510,00 \pm 34,39	101,2	102
	50	850	48,40 \pm 0,96	864,33 \pm 23,71	96,8	101,7
	50	1000	48,23 \pm 4,69	986,00 \pm 50,48	96,5	98,6
A1	-	850	-	824,33 \pm 31,82	-	97
A2	-	850	-	885,00 \pm 10,26	-	104,1
A3	-	850	-	838,00 \pm 3,46	-	98,6
A4	-	850	-	887,33 \pm 16,52	-	104,4
A5	-	850	-	880,67 \pm 15,95	-	103,6

Nota: Vil = vildagliptina. Met = metformina.

Não foram encontradas impurezas nas amostras comerciais avaliadas, o que pode ser sugestivo de um bom controle de qualidade desde a produção na indústria farmacêutica até seu armazenamento e distribuição.

5.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO IV-PLS

5.6.1 Espectros de infravermelho médio de vildagliptina e metformina

A identificação de bandas características dos fármacos no espectro de infravermelho é importante para destacar regiões específicas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento do modelo PLS. As atribuições foram feitas com base no livro de Stuart (2004).

No espectro de infravermelho médio da vildagliptina é possível identificar bandas características das ligações O-H, N-H, do grupo nitrila e do grupo amida

conforme sua estrutura na Figura 4. Todas essas bandas podem ser observadas na Figura 16.

Em $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$ observa-se a sobreposição de duas bandas que são referentes ao estiramento da ligação entre os átomos da hidroxila e a ligação N-H da amina secundária. As bandas de baixa intensidade compreendidas na região entre $1220\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ são comuns de estiramentos da ligação C-N.

As bandas características da amida secundária presente na vildagliptina podem ser observada na região de $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$ com ligação N-H e em $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ com o estiramento do grupo carbonila.

O grupamento nitrila também é facilmente identificado como uma banda de fraca intensidade em $\sim 2240\text{ cm}^{-1}$.

As bandas de forte intensidade que aparecem na região compreendida entre $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ são características de estiramento de ligação C-H enquanto que a deformação angular da ligação C-H aparece em $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$.

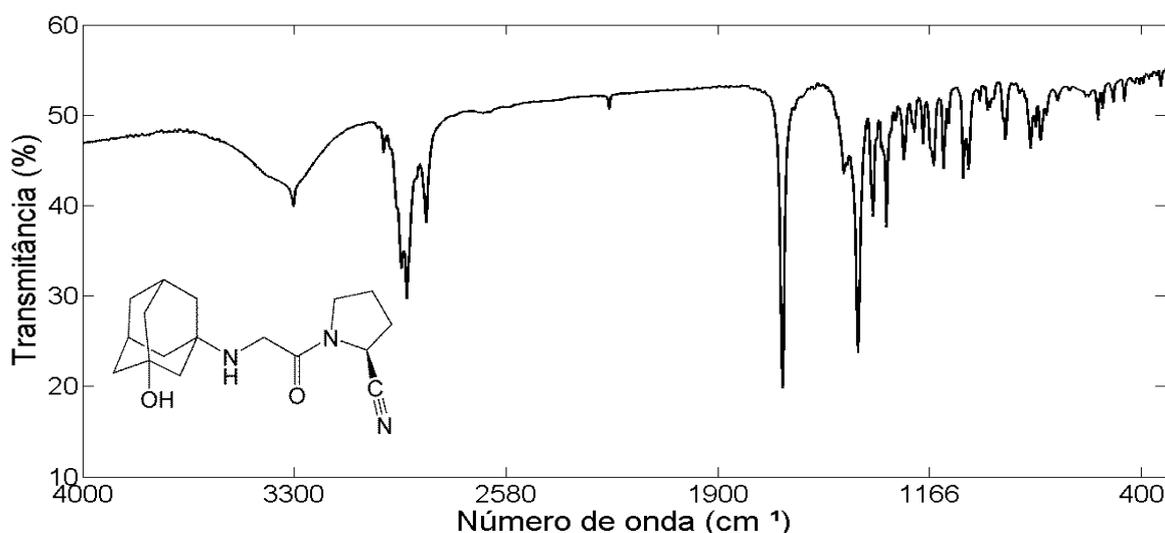


FIGURA 16: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO MÉDIO DA VILDAGLIPTINA EM PASTILHA DE KBr NO MODO TRANSMITÂNCIA.

A estrutura molecular da metformina apresenta uma amina primária, uma amina secundária, uma amina terciária e duas ligações C=N (ver estrutura da molécula na Figura 3A). O espectro de infravermelho da metformina pode ser observado na Figura 17.

A amina primária pode ser identificada através de uma banda forte em $\sim 3330\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da ligação N-H, pela deformação do tipo

tesoura da mesma ligação em $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$ e também pela vibração do tipo balanço e torção em $\sim 800\text{ cm}^{-1}$.

A amina secundária apresenta bandas nas mesmas regiões da amina primária, com exceção da banda em $\sim 800\text{ cm}^{-1}$. Já, a amina terciária aparece como uma banda fraca referente ao estiramento da ligação N-CH₂ em $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$.

A ligação C=N aparece na mesma região da ligação N-H em aproximadamente 1620 cm^{-1} .

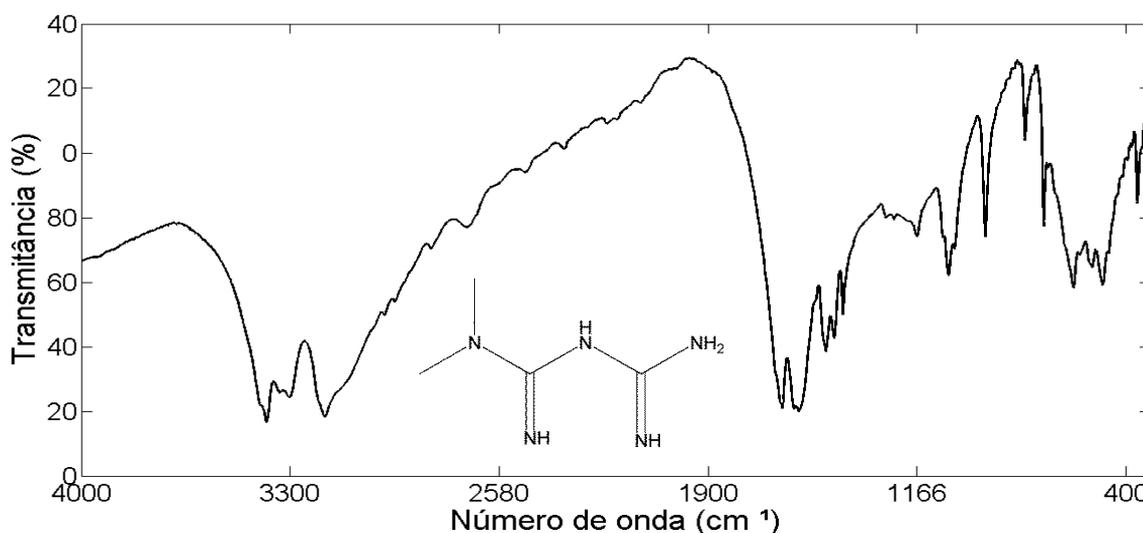


FIGURA 17: ESPECTRO DE INFRAVERMELHO MÉDIO DA METFORMINA EM PASTILHA DE KBr NO MODO TRANSMITÂNCIA.

5.6.2 Planejamento das amostras

O planejamento experimental escolhido para o desenvolvimento do IV-PLS foi do tipo composto central completo. Com esse planejamento é possível obter um grande número de experimentos com um pequeno número de fatores e, além disso, têm-se as vantagens de rotabilidade e blocagem ortogonal (pontos axiais) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O planejamento foi realizado a partir de um ponto central. Neste caso, o ponto central correspondeu a dosagem dos fármacos declarada nas amostras comerciais que é de 50 mg para vildagliptina e 850 mg para metformina.

Além dos fármacos, os comprimidos apresentam excipientes em sua formulação. Na associação farmacêutica de vildagliptina e metformina, o comprimido

apresenta duas partes: uma parte interna, chamada de núcleo, onde se encontram os fármacos e alguns excipientes e uma parte externa, que contém excipientes responsáveis pelo revestimento da forma farmacêutica. Desta forma, além dos fatores vildagliptina e metformina, os fatores de excipientes do núcleo e do revestimento também foram incluídos no planejamento.

Como não foi possível obter o placebo verdadeiro dos comprimidos, um placebo foi montado a partir das informações contidas na bula do medicamento. Na bula, os excipientes são declarados somente qualitativamente e são eles: hiprolose, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio, macrogol, talco e óxido de ferro amarelo.

A hiprolose (ou hidroxipropilcelulose, HPC), o talco e o estearato de magnésio são comumente utilizados em formulações farmacêuticas como diluentes ou lubrificantes, auxiliando no fluxo dos fármacos pelos equipamentos industriais e também na compressão dos comprimidos. Os outros excipientes, a hipromelose (ou hidroxipropilmetilcelulose, HPMC), macrogol e dióxido de titânio podem ser utilizados para a formação do filme de revestimento dos comprimidos. O óxido de ferro amarelo foi utilizado como corante no revestimento, o que é possível de ser observado, a olho nu, nos comprimidos. As concentrações usuais dessas matérias-primas podem ser encontradas em livros como o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE;SHESKEY;OWEN, 2006).

Para o desenvolvimento do planejamento, os excipientes foram formulados dentro de concentrações usuais sugeridas pela literatura. Os excipientes do núcleo utilizados foram 5% de hidroxietilcelulose (substituiu o HPC), 2% de estearato de magnésio e 2% de talco, calculados a partir da quantidade total de fármacos nos comprimidos que é de 900 mg, aproximadamente.

Para a formulação dos excipientes do revestimento foram utilizados as matérias-primas HPMC, macrogol e dióxido de titânio. O HPMC é o principal responsável pela formação do filme de revestimento do comprimido, representando cerca de 90% dos excipientes do revestimento. O macrogol e o dióxido de titânio foram utilizados nas concentrações de 5% cada. O óxido de ferro amarelo, embora seja um dos integrantes dos excipientes de revestimento, não foi incluído, pois é utilizado em concentrações muito baixas (em torno de 0,1%).

Como dito anteriormente, o planejamento foi realizado a partir de um ponto central definido como a dosagem declarada dos fármacos no medicamento. Como a concentrações dos fármacos é alta, a massa do comprimido é grande. O peso médio dos comprimidos da associação farmacêutica é de 1021 mg sendo 50 mg de vildagliptina, 850 mg de metformina, 81 mg de excipientes do núcleo e 40 mg do revestimento. Devido a grande quantidade de matéria-prima que seria gasta para realizar o experimento, optou-se por diminuir proporcionalmente 10 vezes a massa de todos os fatores incluídos no planejamento.

Definido os fatores e suas concentrações, o planejamento foi realizado com auxílio do software *Statistica* versão 10.0. A construção do planejamento foi realizada com variações de até $\pm 20\%$ para os fármacos vildagliptina e metformina e variações de $\pm 10\%$ para os excipientes do núcleo e excipientes do revestimento a partir do ponto central estabelecido.

As massas teóricas das amostras do planejamento estão descritas no Quadro 9 e no Quadro 10 do item 4.6.2.

Após a realização do planejamento, as amostras foram preparadas, os espectros de infravermelho foram adquiridos e os dados organizados para a construção dos modelos usando PLS.

5.6.3 Construção dos modelos usando PLS

A modelagem dos dados foi inicialmente realizada para os fármacos simultaneamente. Foram testados para o bloco X os pré-processamentos 1ª derivada Savitzky-Golay, SNV e MSC isolados e em associação com o pré-processamento centrar na média (CM). Os pré-processamentos foram aplicados tanto ao espectro inteiro quanto para os intervalos espectrais selecionados por meio de siPLS.

Após a modelagem, foram avaliados os parâmetros de RMSEC, RMSECV, RMSEP juntamente com outros fatores como o valor do coeficiente de regressão "r" e a distribuição do erro relativo das amostras de validação. Para os modelos

realizados, não foram obtidos valores satisfatórios dos parâmetros avaliados (dados não mostrados).

Para a determinação dos fármacos simultaneamente, ao realizar o PLS, as matrizes são decompostas em VLs que melhor expliquem a variância dos dados para ambos os fármacos. Porém, em alguns casos, isto implica na construção de um modelo com capacidade de previsão insatisfatória ou até mesmo intermediária para um ou ambos os fármacos. Portanto, optou-se por realizar o PLS, separadamente, para cada fármaco a fim de melhorar a previsão das amostras.

Para a modelagem dos dados também foram realizados os pré-processamentos 1ª derivada Savitzky-Golay, MSC e SNV associados a centrar na média. Estes pré-processamentos foram avaliados para cada intervalo de siPLS testado.

O algoritmo siPLS (PLS por sinergismo de intervalo) é uma extensão do PLS. No siPLS, os espectros são divididos em subintervalos de igual tamanho e para cada subintervalo é construído um modelo PLS. Os subintervalos que apresentam menores erros de RMSECV e RMSEP são selecionados e combinados, formando o novo conjunto de dados a ser utilizado no modelo (PARISOTTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009).

Para o experimento realizado, foram avaliados os intervalos de tamanho 200, 180, 100, 90 e 50 sendo a combinação de intervalos feita automaticamente pelo programa *PLS_Toolbox 6.5*, que opera em ambiente *Matlab 7.13*.

Os resultados de RMSEC, RMSECV, RMSEP, r , erro relativo médio e a região do espectro de infravermelho selecionado por siPLS, para cada pré-processamento e intervalo por ser observada na Tabela 13 e Tabela 14 que se referem à vildagliptina e a metformina, respectivamente.

Os modelos realizados com 1ª derivada Savitzky-Golay para a vildagliptina e para a metformina foram os que apresentam maiores erros relativos individuais das amostras (dados não demonstrados) podendo chegar até a 40%. Por este motivo, estes modelos foram considerados insatisfatórios e não foram utilizados para a previsão das amostras.

Para os pré-processamentos SNV e MSC, tanto para a vildagliptina quanto para a metformina, os valores de RMSEC, RMSECV e RMSEP são semelhantes,

principalmente quando se observa os mesmos intervalos analisados. Porém, os valores de SNV são um pouco melhores.

Dentre os diferentes tamanhos de intervalos avaliados para o pré-processamento SNV mais CM, os intervalos de 50 e 90 variáveis foram os que apresentaram os menores valores de RMSEP. Por fim, o modelo realizado com tamanho de intervalo 50, foi escolhido para a previsão das amostras por apresentar o menor valor de RMSEP e também, o menor valor de erro médio relativo.

TABELA 13: RESULTADOS DA MODELAGEM DOS DADOS ESPECTRAIS POR SIPLS PARA A VILDAGLIPTINA (CONTINUA)

Tamanho intervalo siPLS	Pré-proces.	VLS	RMSEC (mg/0,1g)	RMSECV (mg/0,1g)	RMSEP (mg/0,1g)	R	Erro relativo médio (%)	Var. ¹ em X (%)	Var. em Y (%)	Seleção de variáveis (cm ⁻¹)
200		7	0,16	0,39	0,56	0,09	6,59	95,22	87,8	2864,8-2582,9/ 1164,6 - 882,7
180		6	0,14	0,35	0,38	0,17	6,41	84,28	90,27	1703-1194,4/ 937,9 - 684,3
100		7	0,20	0,40	0,52	0,09	6,86	98,07	80,97	2864,8-2724,6/ 1023-882,7
90	1 ^a DV ² + CM ³	6	0,13	0,36	0,35	0,11	6,07	80,97	91,78	3360,7-3234,6/ 2595,6 -2469,5/ 1703-1576,9/ 1320,5-94,4/ 937,9 - 684,3
50		7	0,18	0,35	0,48	0,03	6,42	97,10	84,76	2864,8-2795,4/ 1164,6-1095,2/ 952,1-882,7
200		9	0,12	0,38	0,45	0,01	5,77	97,29	93,56	2864,8-2582,9/ 1164,6 - 882,7
180	MSC + CM	8	0,14	0,33	0,49	0,11	6,96	96,38	90,30	3998,3-3744,7/ 2978,2-2724,6/ 2213,1-959,5 / 1703-49,4/ 1193-684,3

NOTA: ¹ Var. = variância; ² 1^aDV = primeira derivada e ³ CM = centrado na média.

TABELA 13: RESULTADOS DA MODELAGEM DOS DADOS ESPECTRAIS POR SIPLS PARA A VILDAGLIPTINA (CONCLUSÃO)

Tamanho intervalo siPLS	Pré-proces.	VLs	RMSEC (mg/0,1g)	RMSECV (mg/0,1g)	RMSEP (mg/0,1g)	R	Erro relativo médio (%)	Var. ¹ em X (%)	Var. em Y (%)	Seleção de variáveis (cm ⁻¹)
100		8	0,13	0,37	0,54	0,06	8,16	97,78	92,21	3998,3-3858/ 2864,8-2724,6/ 2581,5-2441,2/ 1306,3-1166,1/ 1023-882,7
90	MSC + CM ²	6	0,15	0,33	0,42	0,14	6,54	92,76	89,36	3360,7-3234,6/ 3105,7-2979,6/ 2723,2-2597,1/ 1703-1576,9/ 1065,5-684,3
50		7	0,22	0,42	0,35	0,31	5,38	94,53	77,31	1093,8-1024,4/ 952,1-882,7
200		7	0,19	0,37	0,4	0,08	5,67	96,61	83,89	2864,8-2582,9/ 1164,6 - 882,7
180		7	0,16	0,33	0,43	0,20	6,35	95,06	88,75	3998,3-3744,7/ 2978,2-2724,6/ 2213,1-1959,5/ 1703-1449,4/ 1193-684,3
100	SNV + CM	7	0,19	0,35	0,43	0,25	6,35	98,17	82,91	1731,4 - 1591,1/ 1023 - 882,7
90		7	0,14	0,37	0,36	0,24	6,05	95,92	90,95	3105,7 - 2979,6/ 1703 - 1576,9/ 937,9 - 684,3
50		7	0,22	0,42	0,35	0,30	5,39	94,48	77,3	1093,8 - 1024,4/ 952,1 - 882,7

NOTA:¹ Var. = variância e ² CM = centrado na média.

TABELA 14: RESULTADOS DA MODELAGEM DOS DADOS POR SIPLS PARA A METFORMINA (CONTINUA)

Tamanho intervalo siPLS	Pré-proces.	VLS	RMSEC (mg/0,1g)	RMSECV (mg/0,1g)	RMSEP (mg/0,1g)	R	Erro relativo médio (%)	Var. ¹ em X (%)	Var. em Y (%)	Seleção de variáveis (cm ⁻¹)
200		6	1,48	4,50	7,54	0,32	6,68	88,86	96,62	3148,2-2528,9/ 1164,6 - 882,7
180		5	2,16	5,56	7,15	0,36	7,28	80,63	92,88	3233,2-2979,6/ 1703 - 939,4
100		6	0,95	4,86	7,89	0,26	8,33	87,70	94,18	3148,2 - 2866,3/ 1731,4 - 1591,1/ 1164,6 - 1024,4
90	1 ^a DV ² + CM ³	7	1,65	5,22	6,73	0,49	6,61	89,30	95,82	3105,7 - 2852,1/ 2723,2 - 2464,5/ 1703 - 1576,9/ 1193 - 1066,9/ 937,9 - 811,8 3998,3 - 3858/ 3573,3 - 3503,8/ 3148,2 - 3078,8/ 2298,1 - 2228,7/ 2085,6 - 1874,5/ 1731,4 - 1662/ 1235,5 - 1095,2/ 881,3- 811,8/ 527,1 - 457,6
50		5	2,59	5,77	7,43	0,46	7,14	74,95	89,74	
200		5	1,80	4,72	6,61	0,42	6,33	95,36	95,06	3148,2 - 2582,9
180	MSC + CM	6	2,28	5,11	5,69	0,48	5,90	98,70	92,04	2978,2 - 2214,5

NOTA: ¹ Var. = variância; ² 1^aDV = primeira derivada e ³ CM = centrado na média.

TABELA 14: RESULTADOS DA MODELAGEM DOS DADOS POR SIPLS PARA A METFORMINA (CONCLUSÃO)

Tamanho intervalo siPLS	Pré-proces.	VLS	RMSEC (mg/0,1g)	RMSECV (mg/0,1g)	RMSEP (mg/0,1g)	R	Erro relativo médio (%)	Var. ¹ em X (%)	Var. em Y (%)	Seleção de variáveis (cm ⁻¹)
100		6	2,37	4,93	7,08	0,30	6,73	97,55	91,43	3148,2 - 2724,6/ 2439,8 - 2299,5/ 1023 - 882,7
90	MSC + CM ²	8	2,37	4,77	5,38	0,45	4,87	98,58	91,41	2723,2 - 2597,1/ 1065,5 - 811,8 3714,9 - 3645,5/ 3360,7 - 3291,3/ 3148,2 - 3078,8/ 2510,6 - 2441,2/ 881,3 - 811,8
50		6	1,98	4,51	5,46	0,49	5,47	94,86	93,98	
200		5	1,80	4,79	6,58	0,42	6,33	95,30	95,03	3148,2 - 2582,9
180		6	2,24	5,22	5,68	0,47	5,90	98,17	92,35	2978,2 - 2214,5
100	SNV + CM	6	2,37	5,02	7,09	0,30	6,75	97,48	91,39	3148,2 - 2724,6/ 2439,8 - 2299,5/ 1023 - 882,7
90		6	1,95	5,20	6,58	0,31	6,51	97,09	94,20	2978,2 - 2852,1/ 2085,6 - 1959,5/ 1320,5 - 1194,4
50		5	2,28	4,50	5,41	0,49	5,34	94,25	92,06	3714,9 - 3645,5/ 3360,7 - 3291,3/ 3148,2 - 3078,8/ 2510,6 - 2441,2/ 881,3 - 811,8

NOTA:¹ Var. = variância e ² CM = centrado na média.

As faixas selecionadas no siPLS para a vildagliptina e para a metformina encontram-se nas Figura 18 e Figura 19.

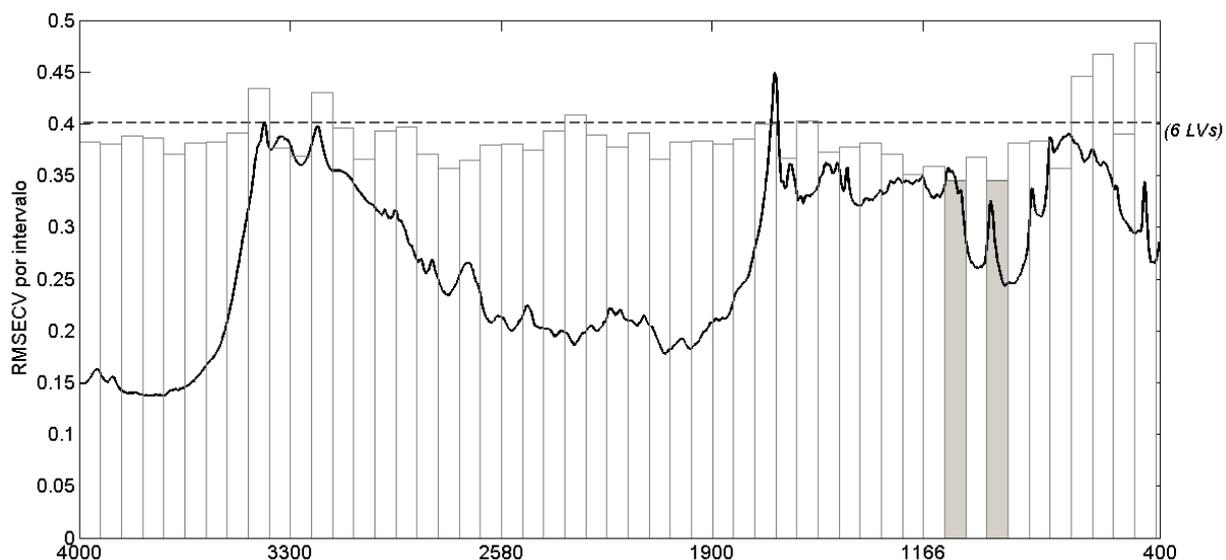


FIGURA 18: VARIÁVEIS SELECIONADAS POR SIPLS PARA VILDAGLIPTINA NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO POR DRIFTS. REGIÕES 1093,8 - 1024,4 E 952,1 - 882,7 CM^{-1} .

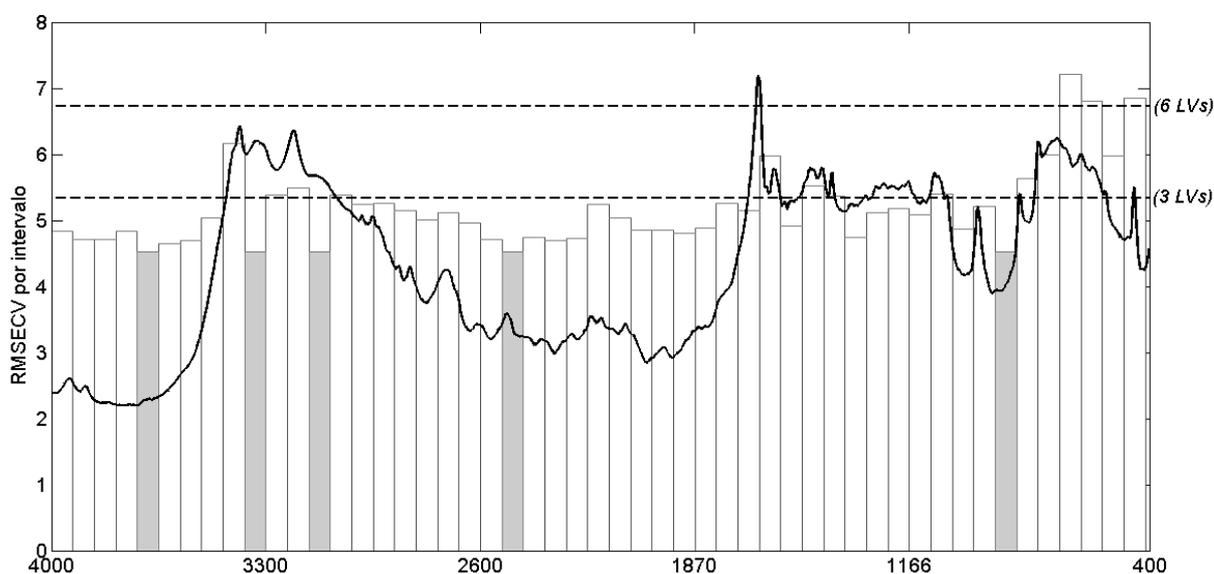


FIGURA 19: VARIÁVEIS SELECIONADAS POR SIPLS PARA METFORMINA NO ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO POR DRIFTS. REGIÕES 3714,9 - 3645,5/ 3360,7 - 3291,3/ 3148,2 - 3078,8/ 2510,6 - 2441,2 E 881,3 - 811,8 CM^{-1} .

Apesar dos modelos siPLS 50 com SNV + CM apresentarem os melhores resultados, o modelo não pode ser considerado excelente. Quando são observados os maiores e menores valores de erro médio relativo de cada amostra, é possível notar uma grande variação.

Para a vildagliptina, os valores de erro relativo variam entre + 14% e – 17,5% enquanto para a metformina variam de +15,5% a -9%. Isto significa que o modelo não está sendo capaz de modelar/incorporar as variações propostas no planejamento, principalmente a variação dos excipientes. As amostras com maiores erros são aquelas que apresentam a maior variação de excipiente do planejamento ($\pm 10\%$), geralmente. Assim, é esperado que o modelo escolhido apresente problemas em prever as amostras reais de comprimidos da associação farmacêutica vildagliptina e metformina, bem como, apresente dificuldade de ser validado.

O modelo escolhido foi considerado satisfatório e seguiu para as etapas de detecção de amostras anômalas nos conjuntos de calibração e validação.

5.6.4 Detecção de *outliers*

A detecção de *outliers* foi realizada primeiramente para as amostras do conjunto de calibração no qual foram analisados resíduos em X e Y e valores de *leverage*. A detecção foi realizada em “rodadas” e a cada rodada, as amostras anômalas eram retiradas e um novo modelo era construído. Para avaliar o melhor modelo, os valores de RMSEC foram observados. Nesta etapa um máximo de 3 rodadas são permitidas para evitar o efeito conhecido como “*snowballing*” (VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2007).

Após a retirada de amostras do conjunto de calibração, a detecção de amostras anômalas foi realizada nas amostras do conjunto de validação através do teste de “Jackknife”.

Para a vildagliptina, nenhuma amostra anômala foi detectada com altos valores de *leverage* ou com altos valores de resíduos em X. Porém, foram encontradas amostras com altos valores de resíduos em Y nas rodadas 1 e 2. Nestas duas rodadas, foram retiradas um total de 4 amostras do conjunto de calibração e o RMSEC diminuiu de 0,25 para 0,16 mg/0,1 g (Tabela 15). Quanto às amostras do conjunto de validação, duas amostras foram detectadas como *outliers* e

retiradas do modelo por apresentarem altos resíduos em Y e pode-se observar a diminuição do RMSEP de 0,36 para 0,27 mg/0,1 g (Tabela 15).

Após a retirada das amostras anômalas, o número de amostras dos conjuntos de calibração e validação foi 42 e 23, respectivamente. Entretanto, essa quantidade de amostras por conjunto está abaixo da quantidade recomendada pela ASTM para o número de variáveis latentes do modelo, que é 7. Segundo a norma E 1655-05 (2012), o número de amostras do conjunto de calibração deve ser $6x(VL + 1)$ enquanto o conjunto de validação deve ser de $4x(VL+1)$. Neste caso, para 7 VLs, seriam esperados 48 e 32 amostras para a calibração e validação, respectivamente.

Porém, quando foram iniciados os experimentos de infravermelho, esperava-se que 5 a 6 VLs seriam suficientes para explicar a variância dos dados uma vez que o número de fatores contemplados no planejamento foram 4. Portanto, para a vildagliptina, não foi possível seguir a recomendação do número de amostras para cada conjunto conforme é proposto pela norma da ASTM (2012). Contudo, essa norma visa propor orientações para a prática de infravermelho associada à calibração multivariada e caso não possa ser cumprida, não inviabiliza o modelo.

TABELA 15: DETECÇÃO DE AMOSTRAS ANÔMALAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS FÁRMACOS VILDAGLIPTINA E METFORMINA.

<i>Vildagliptina</i>					
Modelo	Nominal	Rodada 1	Rodada 2	Jackknife	
Amostras de calibração	46	44	42	42	
Amostras de validação	25	25	25	23	
RMSEC (mg/0,1 g)	0,25	0,19	0,16	0,16	
RMSEP (mg/0,1 g)	0,35	0,36	0,36	0,27	
<i>Metformina</i>					
Modelo	Nominal	Rodada 1	Rodada 2	Rodada 3	Jackknife
Amostras de calibração	46	42	40	38	38
Amostras de validação	25	25	25	25	20
RMSEC (mg/0,1 g)	2,28	1,76	1,60	1,44	1,44
RMSEP (mg/0,1 g)	5,41	5,85	5,72	6,37	3,95

Quanto ao fármaco metformina, na primeira rodada de detecção de *outliers* foram encontradas quatro amostras anômalas, todas com altos valores de resíduos em Y. Após três rodadas, foram retiradas do conjunto de calibração 8 amostras e o RMSEC diminuiu de 2,28 para 1,44 mg/0,1 g.

Na detecção de amostras anômalas no conjunto de validação, 5 amostras foram excluídas e o RMSEP final obtido foi de 3,95 mg/0,1 g.

Para a metformina, a quantidade de amostras para o conjunto de calibração e validação também não seguiu a recomendação dada pela ASTM (2012).

Por fim, os resultados dos modelos de calibração multivariada definidos após a detecção de *outliers* está descrito no Quadro 13.

Realizada a retirada de *outliers*, a próxima etapa foi a validação do método.

Modelo	Vildagliptina	Metformina
Número amostras do conjunto de calibração	42	38
Número amostras do conjunto de validação	23	20
Pré-processamento do bloco X	SNV + CM	SNV + CM
Pré-processamento do bloco Y	CM	CM
Variáveis latentes	7	6
Variância em X (%)	94,63	94,56
Variância em Y (%)	84,36	95,47
Intervalos de variáveis selecionadas (cm ⁻¹)	1093,8 - 1024,4 952,1 - 882,7	3714,9 - 3645,5
		3360,7 - 3291,3
		3148,2 - 3078,8
		2510,6 - 2441,2 881,3 - 811,8
RMSECV (mg/0,1 g)	0,33	4,07
RMSEC (mg/0,1 g)	0,16	1,44
RMSEP (mg/0,1 g)	0,27	3,95
Erro relativo médio (%)	4,75	4,01

QUADRO 13: RESULTADOS DO MODELO DE CALIBRAÇÃO ESCOLHIDO PARA O DESENVOLVIMENTO DO IV-PLS PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA.

5.6.5 Validação do método IV-PLS

Os parâmetros utilizados para avaliar a exatidão do método foram o RMSECV, RMSEC e RMSEP. Dentre estes, o parâmetro mais robusto é o RMSEP,

pois seus valores são referentes a amostras externas (conjunto de validação). Os valores 0,27 e 3,95 mg/0,1 g obtidos para a vildagliptina e metformina, respectivamente, foram considerados satisfatórios (Tabela 16).

Além do RMSEP, a exatidão pode ser avaliada através da observação dos erros relativos de cada amostra do conjunto de validação. Cerca de 50% das amostras apresentaram erros inferiores a 5% e 45% erros entre 5 e 8%, tanto para vildagliptina quanto para a metformina.

A precisão intra-dia (repetitividade) e intermediária foram calculadas em três níveis de concentração, em triplicata. Com exceção da repetitividade do nível de concentração baixo para a metformina, a precisão apresentou desvio padrão relativo menor que 5%, como é estabelecido pela RE nº 899 de 2003 da ANVISA, para ambos os analitos avaliados (Tabela 16).

TABELA 16: RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE IV-PLS PARA OS FÁRMACOS VILDAGLIPTINA E METFORMINA.

Figura de mérito	Parâmetro	Valores	
		Vildagliptina	Metformina
Exatidão (mg/0,1 g)	RMSECV	0,33	4,07
	RMSEC	0,16	1,44
	RMSEP	0,27	3,95
Precisão (DPR%)	Repetitividade		
	Conc. baixa	4,57	7,50
	Conc. média	0,40	2,69
	Conc. alta	4,45	0,11
	Intermediária		
	Conc. baixa	2,64	4,84
	Conc. média	4,27	1,88
	Conc. alta	2,46	0,70
Linearidade	Coeficiente angular	0,75	0,92
	intercepto	1,25	6,20
	r	0,51	0,74
Seletividade (%)		9,36	6,13
Sensibilidade¹		0,17	0,16
Sensibilidade analítica – γ (mg/0,1 g) ⁻¹		290,40	260,72
γ^{-1}		0,003	0,004
LD (mg/0,1 g)		0,01	0,01
LQ (mg/0,1 g)		0,03	0,04
Bias		0,0217	0,297
RPD	Calibração	1,23	1,69
	Validação	1,18	1,34

Nota: ¹ Valor expresso como a razão entre a absorvância e mg/0,1 g.

A linearidade foi avaliada através da distribuição dos resíduos e também pelo gráfico de valores de referência vs valores preditos. Como pode ser observado no gráfico da Figura 20 e com base nos resultados da Tabela 16, a vildagliptina apresenta um valor de r de 0,51. Apesar deste valor não estar em conformidade com a legislação brasileira, não é possível afirmar a falta de linearidade do método.

A linearidade do método pode ser comprovada pela aleatoriedade da distribuição dos resíduos na Figura 20 (BRAGA;POPPI, 2004).

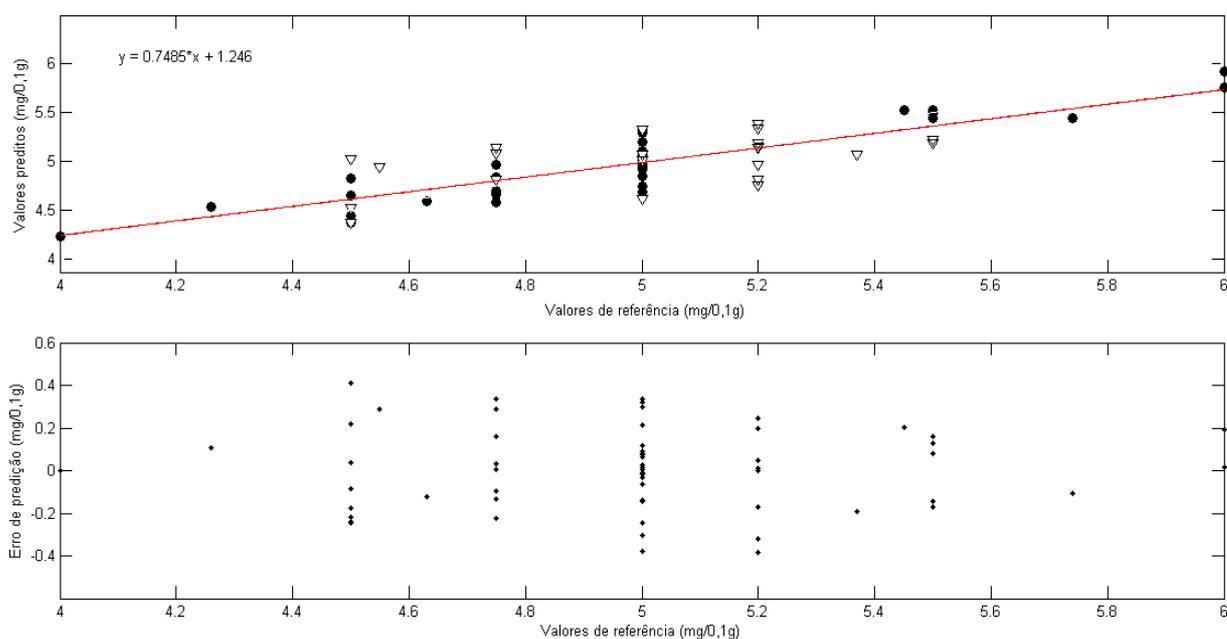


FIGURA 20: GRÁFICO DOS VALORES DE REFERÊNCIA VS PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO PARA A VILDAGLIPTINA.

Nota: (●) amostras do conjunto de calibração e (▽) amostras do conjunto de validação.

Para a metformina, a mesma situação é evidenciada. Apesar do valor de r ser 0,74, não é possível afirmar a falta de linearidade do método (Figura 21).

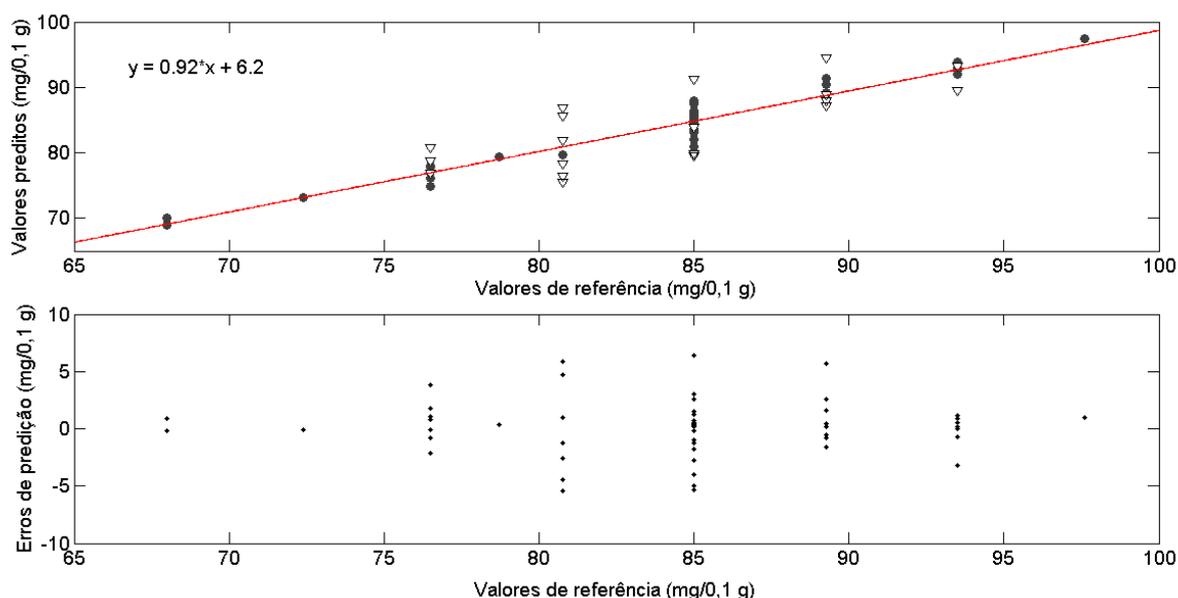


FIGURA 21: GRÁFICO DOS VALORES DE REFERÊNCIA VS PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE DO MÉTODO PARA A METFORMINA.

Nota: (●) amostras do conjunto de calibração e (∇) amostras do conjunto de validação.

O parâmetro de seletividade nos métodos multivariados possui um conceito diferente dos métodos univariados, não tendo muita aplicação para o controle de qualidade de medicamentos. A seletividade informa quanto do sinal analítico é perdido por ortogonalidade, uma vez que, os interferentes são ortogonais aos analitos de interesse (BRAGA;POPPI, 2004). Assim, para a vildagliptina e para a metformina, somente 9,36% e 6,13% do sinal foram utilizados para quantificá-las, respectivamente.

A sensibilidade indica a fração do sinal que é acrescida quando uma unidade de concentração é elevada no analito de interesse (VALDERRAMA;BRAGA;POPPI, 2009). Essa propriedade não é recomendada para a comparação com outros métodos uma vez que é calculada em função da relação sinal/ruído, dependente da técnica analítica e da matriz. Para meios multivariados, a sensibilidade analítica (γ) e principalmente o inverso da sensibilidade analítica (γ^{-1}) tem maior aplicabilidade.

É possível observar na Tabela 16 os valores de γ^{-1} 0,003 e 0,004 mg/0,1 g de vildagliptina e metformina, respectivamente. Esses valores indicam a menor diferença de concentração entre as amostras que pode ser distinguida pelo método considerando o ruído instrumental como única fonte de erros.

Os parâmetros de limite de detecção e quantificação também foram calculados e encontram-se na Tabela 16. Os valores de LD e LQ obtidos para a vildagliptina foram 0,01 e 0,03 mg/0,1 g e para a metformina foram 0,01 e 0,04 mg/0,1 g, respectivamente.

O *bias* ou erro sistemático foi calculado conforme as recomendações da norma E1655-05 da ASTM (2012) e encontra-se descrito no item 3.10.2.6. Os valores obtidos para ambos os fármacos foram menores que o valor de *t* tabelado de 2,069 para vildagliptina e 2,086 para metformina (intervalo de confiança de 95%, com 23 graus de liberdade para a vildagliptina e 20 graus de liberdade para a metformina). Portanto, o erro sistemático pode ser considerado insignificante e desprezível para ambos os fármacos.

Por fim, o último parâmetro de validação avaliado foi o RPD. O RPD é a variação natural das amostras em decorrência de erros que provavelmente ocorrem durante a predição. Valores acima de 2,4 são considerados bons enquanto valores abaixo de 1,5 são considerados inadequados (PATIL *et al.*, 2010). Com exceção do RPD de calibração da metformina, os demais valores obtidos foram menores que 1,5. Contribuíram para esse resultado os baixos valores de desvio padrão e a grande variação de erro relativos das amostras.

5.7 DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS POR IV-PLS E COMPARAÇÃO COM O MÉTODO CLAE-EM/EM

Após o desenvolvimento e a validação do modelo IV-PLS, o mesmo foi aplicado para determinar os fármacos em amostras reais de comprimidos. Este procedimento foi realizado conforme descrito no item 4.9.

Para o fármaco vildagliptina, os teores encontrados para as 10 amostras analisadas variaram entre 99 e 105% e foram considerados satisfatórios. Como a vildagliptina não se encontra descrita em compêndios oficiais, não há ainda uma variação máxima estabelecida em comprimidos. Em geral, para medicamentos que não são de uso controlado, a variação permitida é $\pm 10\%$.

O método quimiométrico foi considerado bom para determinar a vildagliptina em sua associação farmacêutica com a metformina, pois, em comparação com o método CLAE-EM/EM, 80% das amostras apresentaram teores estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$, Tabela 17).

TABELA 17: RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE VILDAGLIPTINA POR CLAE-EM/EM E IV-PLS.

Vildagliptina			
Amostra comercial	Teor obtido por CLAE-EM/EM (%)	Teor obtido por IV-PLS (%)	Valor de p
1	106,57	104,80	0,63
2	102,20	103,57	0,82
3	99,33	104,94	0,16
4	101,30	103,17	0,31
5	104,67	103,54	0,64
6	108,87	103,27	0,11
7	104,27	99,76	0,01
8	96,40	104,13	$3,26^{-4}$
9	99,93	102,17	0,58
10	99,20	101,46	0,62

Para a metformina, a Farmacopéia Brasileira 5^a Ed. (2010) estabelece que o teor pode variar entre 95-105% da dosagem declarada pelo fabricante.

Como pode ser observado na Tabela 18, algumas amostras analisadas por IV-PLS apresentaram teores acima de 105%. Porém, a maioria delas encontra-se dentro da faixa especificada.

Como já foi abordado anteriormente, durante o desenvolvimento do modelo PLS, as amostras do conjunto de validação apresentaram grandes variações em seus erros relativos. Isto decorre de falhas no planejamento experimental, que ao ser realizado, incluiu uma variação muito grande da quantidade de excipientes ($\pm 10\%$) impossibilitando que o modelo incorporasse todas essas variações. Portanto, já era esperado que variações maiores de teores ocorressem.

Porém, quando os teores obtidos por CLAE-EM/EM e IV-PLS foram comparados por meio de teste t, observou-se que 90% das amostras são

estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Assim, é possível considerar o método de calibração satisfatório.

TABELA 18: RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE METFORMINA POR CLAE-EM/EM E IV-PLS

Metformina			
Amostra comercial	Teor obtido por CLAE-EM/EM (%)	Teor obtido por IV-PLS (%)	Valor de p
1	102,39	104,60	0,69
2	102,04	103,35	0,75
3	102,12	108,12	0,08
4	99,73	108,83	0,16
5	100,00	103,88	0,29
6	104,24	103,86	0,96
7	104,04	106,82	0,31
8	101,06	104,06	0,84
9	100,06	102,48	0,79
10	102,39	113,33	0,005

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, duas técnicas diferentes foram desenvolvidas para a determinação da associação farmacêutica metformina e vildagliptina em comprimidos.

A técnica CLAE-EM/EM é seletiva e sensível, ideal para quantificação de fármacos e principalmente detecção de impurezas. Por esta razão foi escolhida para determinar os fármacos na associação farmacêutica e também detectar a presença das impurezas A, B e C da metformina, uma vez que até o presente momento, não há método descrito na literatura para estes fins.

A técnica de IV médio aliada ao PLS vem sendo amplamente estudada como alternativa para métodos cromatográficos, pois não utiliza solventes orgânicos além de proporcionar análises rápidas e não destrutivas da amostra.

O método de CLAE-EM/EM desenvolvido neste trabalho mostrou-se adequado para a quantificação simultânea dos fármacos e a detecção de impurezas da metformina. Além disso, este método apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis conforme as legislações nacionais e internacionais vigentes. A robustez indicou como pontos críticos variações de fluxo e porcentagem de ácido fórmico na fase móvel e temperatura da coluna. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam preparadas conforme a necessidade e analisadas o mais breve possível, como demonstrado no ensaio de estabilidade.

As principais vantagens do método desenvolvido são a rápida análise (3,5 minutos), a alta sensibilidade para detecção de impurezas (picogramas) e a fácil extração dos fármacos dos comprimidos (por meio de metanol). Além disso, o método pode ser aplicado tanto a diferentes dosagens da associação farmacêutica quanto aos fármacos isolados.

As determinações dos fármacos na associação farmacêutica apresentaram teores de 96 a 102% de vildagliptina e 98 a 102% de metformina sendo considerados resultados satisfatórios. Não foram detectadas impurezas da metformina nas análises indicando a boa qualidade do medicamento.

O método de IV-PLS desenvolvido também foi considerado satisfatório para a determinação de metformina e vildagliptina em amostras reais da associação farmacêutica.

Para aumentar a seletividade e sensibilidade do método, optou-se por realizar o PLS1 em que os modelos são construídos individualmente para os fármacos. Ambos os modelos construídos apresentaram como melhor pré-processamento para o bloco X o SNV mais dados centrados na média. Os modelos foram obtidos através do algoritmo siPLS sendo que o intervalo de tamanho 50 apresentou os menores valores de RMSEP para ambos os fármacos.

Após a retirada de amostras anômalas dos conjuntos de calibração e validação, os modelos de calibração foram validados. Os parâmetros de exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica e γ^{-1} foram considerados satisfatórios. Apesar dos valores de $r < 0,99$, os métodos podem ser considerados lineares uma vez que seus resíduos estão aleatoriamente distribuídos.

Além disso, o teste para erro sistemático (“*bias*”) mostrou que os mesmos são insignificantes e desprezíveis para ambos os fármacos.

O parâmetro RPD de calibração e validação apresentou valores abaixo de 1,5, indicando a presença de altos erros nas amostras modeladas.

As principais vantagens da técnica são o baixo custo, a não utilização de solventes orgânicos e geração de resíduos, a não destruição e baixa necessidade de manipulação da amostra e principalmente, a rapidez. Desde o preparo da amostra e seu resultado de teor, o tempo gasto é três vezes menor que a mesma análise por CLAE-EM/EM.

A determinação das amostras reais demonstrou teores entre 99-113% para os fármacos. Quando comparadas as técnicas CLAE-EM/EM e IV-PLS, 80 a 90% das amostras se mostraram estatisticamente semelhantes. Portanto, a técnica por IV pode ser utilizada como alternativa ao método cromatográfico para a determinação de metformina e vildagliptina em comprimidos.

7 REFERÊNCIAS

ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34 n. Suppl 1, p.S62-9, 2011.

ASTM. **E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ed. West Conshohocken, 2012.

BARCELO, A. *et al.* The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 1, p.19-27, 2003.

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Aplicação de métodos de calibração multivariada para determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1638-1643, 2007.

BLANCO, M. *et al.* Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. **Analyst**, v. 123, n. 8, p.135R-150R, 1998.

BLONDE, L. Current antihyperglycemic treatment guidelines and algorithms for patients with type 2 diabetes mellitus. **Am J Med**, v. 123, n. 3 Suppl, p.S12-8, 2010.

BOLLI, G. *et al.* Efficacy and tolerability of vildagliptin vs. pioglitazone when added to metformin: a 24-week, randomized, double-blind study. **Diabetes Obes Metab**, v. 10, n. 1, p.82-90, 2008.

BOTELHO, B. G.; MENDES, B. A. P.; SENA, M. M. Development and Analytical Validation of Robust Near-Infrared Multivariate Calibration Models for the Quality Inspection Control of Mozzarella Cheese. **Food Anal. Methods**, 2012.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p.1004-1011, 2004.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e

Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 27/05/2010.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 125, p.2125-2154, 2000.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; FLESCHEIN, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 45, n. 3, p.206-219, 2010.

CAMPBELL, R. K. Type 2 diabetes: where we are today: an overview of disease burden, current treatments, and treatment strategies. **J Am Pharm Assoc (2003)**, v. 49 Suppl 1, p.S3-9, 2009.

CEFALU, W. T.; URQUHART, S. Clinical management strategies for type 2 diabetes. **JAAPA**, Suppl, p.9-14, 2007.

CHEN, X. *et al.* Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 802, n. 2, p.377-81, 2004.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos **Química Nova**, v. 31, n. 3, p.623-636, 2008.

COLLIN, F. *et al.* Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric identification of the oxidation end-products of metformin in aqueous solutions. **J Mass Spectrom**, v. 39, n. 8, p.890-902, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

CROXTALL, J. D.; KEAM, S. J. Vildagliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus. **Drugs**, v. 68, n. 16, p.2387-409, 2008.

DING, C. G. *et al.* Simultaneous determination of metformin and glipizide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**, v. 21, n. 2, p.132-8, 2007.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clin Biochem**, v. 36, n. 6, p.471-81, 2003.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell Metab**, v. 3, n. 3, p.153-65, 2006.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

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

EL-BAGARY, R. I.; ELKADY, E. F.; AYOUB, B. M. Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Vildagliptin in the Presence of its Synthetic Intermediate and the Simultaneous Determination of Pioglitazone Hydrochloride and metformin Hydrochloride. **International Journal of Biomedical Science**, v. 7, n. 3, p.201-208, 2011b.

FERRANNINI, E. *et al.* Fifty-two-week efficacy and safety of vildagliptin vs. glimepiride in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin monotherapy. **Diabetes Obes Metab**, v. 11, n. 2, p.157-66, 2009.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, 2012.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p.724-731, 1999.

FUJIOKA, K. Pathophysiology of type 2 diabetes and the role of incretin hormones and beta-cell dysfunction. **JAAPA**, Suppl, p.3-8, 2007.

GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N.; LUNDSTEDT, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. **J Chemometrics**, v. 16, p.141-160, 2002.

GEORGITA, C. *et al.* Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 854, n. 1-2, p.211-8, 2007.

GEORGITA, C. *et al.* Comparison of a LC/MS method with a LC/UV method for the determination of metformin in plasma samples. **Farmacia**, v. 58, n. 2, p.158-169, 2010.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. In: GIL, E. S. (Ed.). **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 47-52.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p.140-50, 2003.

GOKE, B. Islet cell function: alpha and beta cells--partners towards normoglycaemia. **Int J Clin Pract Suppl**, n. 159, p.2-7, 2008.

GONZALEZ, O. *et al.* Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 3-4, p.243-252, 2011.

HABIB, I. H. I.; KAMEL, M. S. Near infra-red reflectance spectroscopic determination of metformin in tablets. **Talanta**, v. 60, n. 1, p.185-190, 2003.

HEINIG, K.; BUCHELI, F. Ultra-fast quantitative bioanalysis of a pharmaceutical compound using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 795, n. 2, p.337-46, 2003.

HESS, C.; MUSSHOFF, F.; MADEA, B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 400, n. 1, p.33-41, 2011.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopy Methods in Organic Chemistry**. 2^a. ed: Thieme, 2008.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios da Análise Instrumental**. 6^a. ed, 2009.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1). Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 20/05/2010.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 20, p.1357-67, 2005.

KOSEKI, N. *et al.* Development and validation for high selective quantitative determination of metformin in human plasma by cation exchanging with normal-phase LC/MS/MS. **J Pharm Biomed Anal**, v. 36, n. 5, p.1063-72, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th. ed. New York, 2005.

LI, N. *et al.* A rapid and reliable UPLC-MS/MS method for the identification and quantification of fourteen synthetic anti-diabetic drugs in adulterated Chinese proprietary medicines and dietary supplements. **Biomed Chromatogr**, v. 24, n. 11, p.1255-61, 2010.

LIM, C. K.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 5, p.547-57, 2002.

LIMA, K. M. G. *et al.* Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1635-1643, 2009.

LIU, A.; COLEMAN, S. P. Determination of metformin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 29, p.3695-700, 2009.

LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B. R. Net analyte signal calculation in multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p.1620-1626, 1997.

MARQUES, M. A. *et al.* Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 852, n. 1-2, p.308-16, 2007.

MARTIN, J. *et al.* High-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry method for the analysis of antidiabetic drugs in aqueous environmental samples. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 895, p.94-101, 2012.

MATHIEU, C. The scientific evidence: vildagliptin and the benefits of islet enhancement. **Diabetes Obes Metab**, v. 11 Suppl 2, p.9-17, 2009.

MATTHEWS, D. R. *et al.* Vildagliptin add-on to metformin produces similar efficacy and reduced hypoglycaemic risk compared with glimepiride, with no weight gain: results from a 2-year study. **Diabetes Obes Metab**, v. 12, n. 9, p.780-9, 2010.

MISTRI, H. N.; JANGID, A. G.; SHRIVASTAV, P. S. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma. **J Pharm Biomed Anal**, v. 45, n. 1, p.97-106, 2007.

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

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. D. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p.556-563, 2003.

NATHAN, D. M. *et al.* Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p.193-203, 2009.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1401-1406, 2006.

PANG, W. *et al.* LC-MS–MS in MRM Mode for Detection and Structural Identification of Synthetic Hypoglycemic Drugs Added Illegally to 'Natural' Anti-Diabetic Herbal Products. **Chromatographia**, v. 70, n. 9/10, p.1353-1359, 2009.

PARISOTTO, G. *et al.* Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. **Orbital**, v. 1, n. 1, p.38-48, 2009.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p.198-219, 2003.

PATIL, A. G. *et al.* Nondestructive estimation of fatty acid composition in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds using Near-Infrared Transmittance Spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p.1210-1217, 2010.

RHODES, C. J.; WHITE, M. F. Molecular insights into insulin action and secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p.3-13, 2002.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RINNAN, A. S.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p.1201-1222, 2009.

ROGGO, Y. *et al.* A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 3, p.683-700, 2007.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 5^a. ed, 2006.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 3^a. ed. Itapevi, 2009.

SCHARDER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy: method and applications**. 1. ed: VCH, 1995.

SENA, M. M. *et al.* Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p.75-79, 2007.

SENA, M. M. *et al.* Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p.547-556, 2000.

SENGUPTA, P. *et al.* LC-MS-MS Development and Validation for Simultaneous Quantitation of Metformin, Glimepiride and Pioglitazone in Human Plasma and Its Application to a Bioequivalence Study. **Chromatographia**, v. 69, n. 11-12, p.1243-1250, 2009.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p.171-6, 2000.

SILVA, F. E. B. *et al.* Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p.800-805, 2009.

SILVA, M. A. *et al.* Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, n., p.342-51, 2012.

SINGH, S. K.; MANNE, N.; PAL, M. Synthesis of (S)-1-(2-chloroacetyl)pyrrolidine-2-carbonitrile: a key intermediate for dipeptidyl peptidase IV inhibitors. **Beilstein J Org Chem**, v. 4, p.20, 2008.

SORENSEN, L. K. Determination of metformin and other biguanides in forensic whole blood samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**, v. 26, n. 1, p.1-5, 2012.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p.223-229, 2012.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p.25-35, 2005.

STRATTON, I. M. *et al.* Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ**, v. 321, n. 7258, p.405-12, 2000.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. ed: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, n. 9467, p.1333-46, 2005.

SWALES, J. G.; GALLAGHER, R.; PETER, R. M. Determination of metformin in mouse, rat, dog and human plasma samples by laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v. 53, n. 3, p.740-4, 2010.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.338-350, 2006.

THEVIS, M.; GEYER, H.; SCHANZER, W. Identification of oral antidiabetics and their metabolites in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry--a matter for doping control analysis. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 19, n. 7, p.928-36, 2005.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 31. ed: Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de método em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectrometria no infravermelho próximo.** 128 f. - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2005.

VALDERRAMA, P. **Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia** 230 f. - Instituto de Química, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2009.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.8331-8338, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1278-1287, 2009.

VAN NUIJS, A. L. *et al.* Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 5, p.2211-22, 2010.

WANG, Y. *et al.* Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of metformin in human plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 808, n. 2, p.215-9, 2004.

WILD, S. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p.1047-53, 2004.

ZHANG, L. *et al.* Simultaneous determination of metformin and rosiglitazone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray ionization: application to a pharmacokinetic study. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 854, n. 1-2, p.91-8, 2007.

ZHANG, W. *et al.* Determination of metformin in rat plasma by HILIC-MS/MS combined with Tecan automation and direct injection. **Biomed Chromatogr**, 2011.

ZHONG, G. P. *et al.* Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers. **J Mass Spectrom**, v. 40, n. 11, p.1462-71, 2005.