

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA CAROLINA GIMENEZ**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM  
PLASMA HUMANO UTILIZANDO UM MÉTODO HILIC-EM/EM**



**CURITIBA**

**2014**

---

**ANA CAROLINA GIMENEZ**

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM  
PLASMA HUMANO UTILIZANDO UM MÉTODO HILIC-EM/EM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Coorientador: Dr. João Cleverson Gasparetto

**CURITIBA**

**2014**

---

---

Dedico com muito amor e carinho a meus pais,  
Antonio Carlos Gimenez e Maria Angela Gimenez,  
por toda coragem, força, amor, carinho e apoio incondicional.

---

---

## AGRADECIMENTOS

*À minha família, meu bem maior e mais precioso. Meus pais, meus maiores exemplos de vida e força. Meus irmãos, pelo apoio incondicional em todos os momentos e meus sobrinhos, que enchem minha vida de alegria e amor, tornando qualquer jornada muito mais leve.*

*Ao meu orientador professor Doutor Roberto Pontarolo por acreditar no meu potencial, me guiar e pela paciência em me ajudar a concretizar esse projeto.*

*Ao meu querido Co-orientador Dr. João Cleverson Gasparetto, por todo ensinamento, apoio, incentivo, enorme e valiosa contribuição no meu processo de aprendizagem e desenvolvimento. Muito obrigada pela amizade e alegria compartilhada, por me fazer acreditar e não desistir nos momentos mais difíceis dessa caminhada.*

*Aos valiosos colegas do Centro de Estudos em Biofarmácia da UFPR, Rômulo, Thaís, Raquel, Flavia, Carol, Marco, por toda prestatividade e espírito de equipe. A ajuda de cada um de vocês foi essencial e sem ela eu não teria conseguido. Muito obrigada!*

*Aos meus queridos amigos de mestrado, Andressa, Suelem, Thiago e todo nosso “grupo de apoio” por compartilharem alegrias, pela dedicação e amizade, que levarei comigo para toda vida.*

*A toda direção, gerência e colegas do laboratório Diagnósticos do Brasil por acreditarem no meu potencial e investirem na minha formação, capacitação e proporcionarem essa realização pessoal e profissional.*

---

---

*“(…) Vamos viver  
Temos muito ainda por fazer  
Não olhe para trás  
Apenas começamos”*

*Renato Russo*

---

---

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método HILIC-EM/EM para quantificar em plasma humano metformina e vildagliptina. A pré-purificação dos analitos foi realizada através da técnica de precipitação de proteínas com acetonitrila acidificada (0,1% ácido fórmico). A fonte de ionização por *electrospray* operou no modo positivo de ionização e a separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Atlantis HILIC Silica 150 x 2,1 mm, 3 µm de tamanho de partícula. O volume de injeção foi de 5 µL e a temperatura de forno mantida a 40 °C. A fase móvel isocrática consistiu de (A) 20% de água e (B) 80% de solução acetonitrila:água (95:5 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 3 mM de formiato de amônio. O fluxo foi mantido em 400 µL/min. Os resultados de validação mostraram que o novo método é seletivo, sensível (limite de detecção < 1,5 ng/mL) e livre de efeitos residual e de matriz. O novo método também foi preciso (CV < 9,0%), exato (ER < 11,2%) e linear ( $r \geq 0,99$ ) dentro dos limites de 5 a 500 ng/mL de cada composto. Nos diferentes níveis de concentração das curvas de calibração, as variações de precisão e exatidão foram < 9,6%. A recuperação dos analitos e padrões internos (>75%) foi obtida com elevada precisão (CV < 4,0%). O método desenvolvido foi aplicado com sucesso em amostras reais de voluntários que receberam separadamente uma dose de metformina (850 mg), uma dose de vildagliptina (50 mg) ou uma dose de um medicamento contendo a combinação metformina e vildagliptina (850 mg + 50 mg). O novo método pode ser utilizado como uma ferramenta analítica para o monitoramento clínico da metformina e vildagliptina no plasma. A partir desse monitoramento, é possível verificar a adesão ao tratamento e propor ajuste de dose de modo a garantir a efetividade e a segurança clínica do tratamento.

**Palavras chave:** metformina, vildagliptina, CLAE-EM/EM, plasma, HILIC, diabetes.

---

---

## ABSTRACT

The objective of this work was to develop and validate a HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma. Sample cleanup was achieved using protein precipitation with acetonitrile containing 0.1% formic acid. The electrospray source was operated in the positive ion mode. Chromatographic separation was achieved using an Atlantis HILIC Silica 150 x 2.1-mm, 3- $\mu$ m particle size column maintained at 40 °C. The isocratic mobile phase consisted of 20% water and 80% acetonitrile/water solution 95:5 v/v, containing both 0.1% formic acid and 3 mM ammonium formate. The flow rate was maintained at 400  $\mu$ L/min. The volume of injection was 5.0  $\mu$ L. Data from validation studies demonstrated that the new method is highly selective, sensitive (limits of detection < 1.5 ng/mL) and free of matrix and residual effects. The new method was also precise (RSD<9.0%), accurate (RE<11.2%) and linear ( $r \geq 0.99$ ) over the ranges of 5 to 500 ng/mL for each compound. The individual values for accuracy and precision at each concentration level were lower than 9.6%. For all compounds, satisfactory recovery (>75%) was achieved with high reproducibility (RSD<4.0%). The developed method was successfully applied to determine metformin and vildagliptin in plasma volunteers who orally received a single dose of metformin (850 mg), vildagliptin (50 mg) or drug association (metformin 850 mg + vildagliptin 50 mg). The new method can thus be used as a tool for the clinical monitoring of metformin and vildagliptin.

**Keywords:** metformin, vildagliptin, LC-MS/MS, human plasma, HILIC.

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	– Adenosina trifosfato
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas e recursos <i>Tandem</i>
CG	– Cromatografia gasosa
CQ	– Amostra de controle de qualidade
CQA	– Amostra de controle de qualidade de alta concentração
CQB	– Amostra de controle de qualidade de baixa concentração
CQD	– Amostra de controle de qualidade de diluição
CQ-LIQ	– Amostras de controle de qualidade do limite inferior de quantificação
CQM	– Amostra de controle de qualidade de média concentração
CV	– Coeficiente de variação
DM	– <i>Diabetes mellitus</i>
DMT2	– <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DPP4	– Dipeptil peptidase-4
EM	– Espectrometria de massas
ER	– Erro relativo
ESI	– Ionização por <i>electrospray</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FIA	– Análise por injeção em fluxo
FMN	– Fator de matriz normalizado
HBA1C	– Hemoglobina glicada
HILIC	– Cromatografia líquida de interação hidrofílica
HILIC-EM/EM	– Cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas sequencial
HLB	– Balanço hidrofílico-lipofílico
IRS	– Proteína substrato do receptor de insulina
LD	– Limite de detecção
LIQ	– Limite inferior de quantificação
mM	– Milimolar
µL	– Microlitro
MRM	– Monitoramento de reações múltiplas
<i>m/z</i>	– Razão massa/carga

---

---

pH	–	Potencial hidrogeniônico
PI	–	Padrão interno
PIs	–	Padrões internos
pKa	–	Logarítimo negativo da constante de acidez
PPT	-	Precipitação de proteínas
PTFE	–	Politetrafluoretileno
r	–	Coefficiente de correlação
SPE	–	Extração em fase sólida
v/v	–	volume/volume
v/v/v	–	volume/volume/volume

---

---

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 -	CÁLCULO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.....	43
EQUAÇÃO 2 -	CÁLCULO DO ERRO RELATIVO.....	43
EQUAÇÃO 3 -	CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO.....	44
EQUAÇÃO 4 -	CÁLCULO DO DESVIO PADRÃO RELATIVO UTILIZADO NO ENSAIO DE PRECISÃO.....	45
EQUAÇÃO 5 -	CÁLCULO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN)..	45

---

---

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE (A) METFORMINA, (B) METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B, (C) VILDAGLIPTINA E (D) PIRANTEL.....	25
FIGURA 2 –	ESPECTROS DE MRM GERADOS PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA RESPECTIVAMENTE.....	52
FIGURA 3 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM METFORMINA, VILDAGLIPTINA, METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B E PIRANTEL.....	55
FIGURA 4 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DA SELETIVIDADE.....	58
FIGURA 5 –	EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA METFORMINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR $1/x*x$ .....	59
FIGURA 6 –	EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA VILDAGLIPTINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR $1/x*x$ .....	60
FIGURA 7 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE (A) AMOSTRAS CONTROLE PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO E (B) AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO.	61

---

---

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO EM PLASMA DA METFORMINA, VILDAGLIPTINA, METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B (MetB) E PIRANTEL.....	37
TABELA 2 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	42
TABELA 3 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA METFORMINA.....	59
TABELA 4 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VILDAGLIPTINA.....	60
TABELA 5 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO HILIC-EM/EM.....	62
TABELA 6 –	RECUPERAÇÃO DA METFORMINA, VILDAGLIPTINA, PIRANTEL (PI) E METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B (PI) OBTIDAS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA (0,1% ÁCIDO FÓRMICO).....	63
TABELA 7 –	VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DA METFORMINA E VILDAGLIPTINA CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ.....	63
TABELA 8 –	CO-ELUIÇÃO DE PARES DOS ANALITOS E AS EXTENSÕES RELATIVAS DO AUMENTO OU SUPRESSÃO IÔNICA MEDIDAS COM O NOVO MÉTODO HILIC-EM/EM.....	64
TABELA 9 –	ESTABILIDADE DA METFORMINA, VILDAGLIPTINA, PIRANTEL E METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B (METB) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	65
TABELA 10 –	QUANTIDADE DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA DETERMINADA NO PLASMA DE VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM MEDICAMENTOS CONTENDO OS FÁRMACOS SEPARADOS OU EM TERAPIA COMBINADA.....	66

---

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	OBJETIVO GERAL.....	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1	<i>DIABETES MELLITUS</i> .....	19
2.2	FISIOPATOLOGIA DO <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2.....	20
2.3	DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2.....	22
2.4	TRATAMENTO DO <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2.....	22
2.5	ASSOCIAÇÃO METFORMINA E VILDAGLIPTINA.....	23
2.6	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA METFORMINA E DA VILDAGLIPTINA.....	24
2.7	CLAE, ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MÉTODOS PROPOSTOS PARA DETERMINAÇÃO DA METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM PLASMA HUMANO.....	25
2.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	27
2.9	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO APLICADOS EM ENSAIOS BIOANALÍTICOS.....	30
2.9.1	Extração por precipitação de proteínas.....	30
2.9.2	Extração líquido-líquido.....	32
2.9.3	Extração em fase sólida.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA, PADRÕES ANALÍTICOS, PADRÕES INTERNOS, ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA E REAGENTES.....	35
3.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	35
3.3	INSTRUMENTAÇÃO.....	36
3.4	TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAIR DO PLASMA OS ANALITOS E OS PADRÕES INTERNOS.....	37
3.5	PREPARO DA AMOSTRA PARA O ESTUDO DE VALIDAÇÃO.....	38
3.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	39
3.6.1	Limite de detecção e limite inferior de quantificação .....	39
3.6.2	Seletividade.....	40
3.6.3	Linearidade.....	40
3.6.4	Amostras de controle de qualidade.....	41
3.6.5	Efeito residual.....	42
3.6.6	Precisão e exatidão.....	43
3.6.7	Teste de recuperação.....	44
3.6.8	Efeito matriz.....	44
3.6.9	Teste de supressão iônica.....	45
3.6.10	Teste de estabilidade.....	46

---

---

3.6.10.1	Estabilidade de curta duração.....	46
3.6.10.2	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.....	47
3.6.10.3	Estabilidade de longa duração.....	47
3.6.10.4	Teste de estabilidade pós-processamento.....	48
3.6.10.5	Estabilidade das soluções estoque.....	48
3.6.10.6	Estabilidade das soluções de trabalho.....	49
3.7	DECLARAÇÃO DE ÉTICA.....	49
3.8	VOLUNTÁRIOS, COLETA DE AMOSTRA E APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	49
3.9	PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS VOLUNTÁRIOS.....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
4.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO HILIC-EM/EM.....	52
4.2	TESTES DE EXTRAÇÃO / PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA.....	55
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODOS BIOANALÍTICO.....	56
4.3.1	Limites de detecção e limite inferior de quantificação.....	56
4.3.2	Seletividade.....	57
4.3.3	Linearidade.....	58
4.3.4	Teste de efeito residual ( <i>Carry over test</i> ).....	61
4.3.5	Precisão e exatidão.....	62
4.3.6	Teste de recuperação.....	63
4.3.7	Efeito matriz.....	63
4.3.8	Teste do aumento/supressão iônica.....	64
4.3.9	Teste de estabilidade.....	65
4.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	67
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>		<b>78</b>

---

---

# ***1. INTRODUÇÃO***

---

Falhas na secreção e/ou ação da insulina podem levar a um grupo de doenças metabólicas chamado de *diabetes mellitus*. A estimativa para 2030 é de mais de 300 milhões de diabéticos em todo o mundo, sendo 90% destes casos correspondentes ao *diabetes mellitus* tipo 2 (insulino independente) (ADA, 2011).

O tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) inicia com modificações no estilo de vida e, associado a isto, monoterapia medicamentosa. Nesse caso, a metformina é o fármaco de primeira escolha (NATHAN *et al.*, 2009). Também é aplicado ao diabetes gestacional e a síndromes metabólicas, no qual a hiperinsulinemia esteja presente (CAMPBELL; HOWLETT, 1995).

Quando as metas de nível glicêmico e de hemoglobina glicada não são alcançadas utilizando metformina, outras terapias medicamentosas podem ser introduzidas com o objetivo de controlar a doença (NATHAN *et al.*, 2009). Um exemplo é a terapia combinada da metformina com a vildagliptina, cuja associação apresenta como vantagem o baixo risco de hipoglicemia e índices insignificantes de ganho de peso quando comparado com outras classes de fármacos antidiabéticos (FERRANNINI *et al.*, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2010).

A quantificação simultânea da metformina e da vildagliptina no plasma humano é muito importante para a condução de estudos farmacocinéticos e para o monitoramento terapêutico dessas substâncias. Apesar disso, poucos métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PHARNE *et al.*, 2012) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) (HESS; MUSSHOF; MADEA, 2011) foram descritos na literatura para a determinação da vildagliptina em plasma humano.

Para a determinação da metformina vários métodos foram descritos, incluindo as técnicas de electroforese capilar (SONG *et al.*, 1998), cromatografia em fase gasosa (CG) (BROHON; NOEL, 1978; LENNARD *et al.*, 1978), CLAE (YUEN; PEH, 1998; CHENG; CHOU, 2001; TACHE *et al.*, 2001; ZARGHI *et al.*, 2003; AMINI; AHMADIANI; GAZERANI, 2005; BHAVESH *et al.*, 2007; YARDIMCI; OZALTIN; GURLEK, 2007; PORTA *et al.*, 2008; HUTTUNEN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; RANETTI *et al.*, 2009; GABR; PADWAL; BROCKS, 2010; GOPI *et al.*, 2012; CHHETRI; THAPAA; SCHEPDAELB, 2013; SIDDIQUIA *et al.*, 2013; RASHID *et al.*, 2014) e CLAE-EM/EM (CHEN *et al.*, 2004; KOSEKI *et al.*, 2005; GEORGITA *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2007; LIU; COLEMAN, 2009; GEORGITÃ *et al.*, 2010; SWALES; GALLAGHER; PETER, 2010; CHEN *et al.*, 2011; BONDE *et al.*, 2013; LI

---

*et al.*, 2013; POLAGANIA *et al.*, 2013). Entretanto, a maioria desses métodos apresentam desvantagens.

A electroforese capilar utiliza uma técnica de análise por campo amplificado, um sistema incomum para aplicação em análises de rotina (SONG *et al.*, 1998). Os métodos por CG necessitam de etapas de derivatização antes da injeção, fato que torna o preparo da amostra oneroso e laborioso (BROHON; NOEL, 1978; LENNARD *et al.*, 1978). Os métodos baseados em CLAE apresentam moderada sensibilidade e seletividade quando aplicados a matrizes complexas, como o plasma, e assim tempos longos de corrida ou procedimentos complexos de pré-tratamento da amostra são necessários para garantir seletividade adequada do método. Grande parte dos métodos citados acima também não foram devidamente validados de acordo com os guias internacionais de validação (SONG *et al.*, 1998; YUEN; PEH, 1998; TACHE *et al.*, 2001; ZARGHI *et al.*, 2003; BHAVESH *et al.*, 2007; GEORGITA *et al.*, 2007; YARDIMCI; OZALTIN; GURLEK, 2007; PORTA *et al.*, 2008; GEORGITÃ *et al.*, 2010; GOPI *et al.*, 2012; PHARNE *et al.*, 2012; CHHETRI; THAPAA; SCHEPDAELB, 2013; SIDDIQUIA *et al.*, 2013). Cabe mencionar que a validação é a demonstração de que o método é adequado para a sua finalidade específica (FDA, 2013).

Nos últimos anos, a utilização de CLAE-EM/EM demonstrou diversas vantagens em relação a outras técnicas, tais como a sensibilidade e a capacidade de analisar matrizes complexas com elevada seletividade. Apesar disso, nenhum dos métodos descritos por CLAE-EM/EM (CHEN *et al.*, 2004; KOSEKI *et al.*, 2005; GEORGITA *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2007; LIU; COLEMAN, 2009; GEORGITÃ *et al.*, 2010; SWALES; GALLAGHER; PETER, 2010; CHEN *et al.*, 2011; BONDE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; POLAGANIA *et al.*, 2013) monitora simultaneamente metformina e vildagliptina no plasma humano, provavelmente devido às dificuldades de se desenvolver um método em que as substâncias apresentam características físico-químicas muito distintas (a metformina é altamente polar enquanto a vildagliptina apresenta característica apolar) (HUTTUNEN *et al.*, 2009). Nesse contexto a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) já provou ser uma ferramenta poderosa de separação de compostos quando comparada à tradicional cromatografia de fase reversa (ALPERT, 1990; YANG; BOYSEN; HEARN, 2009). No modo HILIC, a eluição dos compostos é dada de acordo com as características hidrofílicas de cada substância, e devido aos

---

diferentes mecanismos de interação, HILIC também opera em modo contínuo de hidrofobicidade-hidrofilicidade. Devido a essas características, o interesse em métodos por cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas sequencial (HILIC-EM/EM) tem aumentado nos últimos anos, especialmente porque no modo HILIC se utiliza de uma predominância de solvente orgânico na fase móvel, fato que favorece a ionização dos compostos e aumenta a sensibilidade no detector (YANG; BOYSEN; HEARN, 2009).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método bioanalítico por HILIC-EM/EM para a determinação simultânea de metformina e vildagliptina em plasma humano. Além do ineditismo quanto a sua finalidade, o novo método apresenta como vantagens rapidez, baixo custo no preparo da amostra e alta seletividade e sensibilidade comparado a outros métodos descritos na literatura.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por HILIC-EM/EM para quantificação simultânea de metformina e vildagliptina em plasma humano.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método otimizando os parâmetros individuais dos analitos e padrões internos no espectrômetro de massas bem como definir as melhores condições cromatográficas;
  - Definir a melhor técnica para o pré-tratamento da amostra;
  - Aplicar o método desenvolvido e validado para quantificar a metformina e a vildagliptina em amostras reais de plasma de pacientes que fazem uso de medicamentos contendo essas substâncias na forma de monoterapia ou terapia combinada.
-

---

## ***2. REVISÃO DA LITERATURA***

---

---

---

## 2.1 DIABETES MELLITUS

O *diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas que promove hiperglicemia, cuja causa é a deficiência de secreção ou ação da insulina ou ambas (SBD, 2009). Quando não tratada a hiperglicemia leva a quadros de retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica, neuropatias autonômicas, disfunção sexual, aumento na incidência de aterosclerose, hipertensão e doenças cerebrovasculares. Em longo prazo, as complicações são mais severas podendo levar a falência de inúmeros órgãos, tais como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2011).

No ano 2000 a prevalência do diabetes era de 171 milhões de pessoas em todo o mundo. Entretanto, para o ano de 2030 são estimados mais de 300 milhões de indivíduos com a doença (WILD *et al.*, 2004; ADA, 2011). No Brasil, estima-se que o número de diabéticos passe dos 4,6 milhões para 11,3 milhões, situando-se entre os dez países com maior prevalência da doença (WILD *et al.*, 2004). Os gastos com consultas, tratamento e internações já alcançaram a marca de US\$ 3,9 bilhões no país e considerando os custos indiretos como óbito prematuro, incapacidade de trabalho ou ociosidade o custo pode chegar a US\$ 22,6 bilhões (BARCELO *et al.*, 2003).

O diabetes é classificado segundo a sua etiologia e não quanto ao tipo de tratamento. Assim, a Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda que se utilize os termos *diabetes mellitus* tipo 1 e *diabetes mellitus* tipo 2 ao invés de insulino dependentes e insulino independentes (SBD, 2009). O *diabetes mellitus* tipo 1 corresponde de 5 a 10% dos casos da doença e está associado a destruição total ou parcial das células  $\beta$ -pancreáticas. Dessa forma ocorre deficiência na secreção de insulina, fato que leva ao quadro de hiperglicemia. A causa é autoimune e os pacientes necessitam de insulina exógena para sobreviver (SBD, 2009; ADA, 2011).

Já o *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) está presente em 90 a 95% dos casos da doença e sua etiologia não é totalmente compreendida. Em geral o DMT2 se manifesta após estresse causado por outra doença, como por exemplo, uma simples infecção. Na maioria das vezes não há necessidade de insulina exógena para o tratamento do DMT2, apenas modificações no estilo de vida e tratamento

---

medicamentoso. Entretanto, em muitos casos o uso de insulina é necessário para o controle adequado da glicemia e para redução dos riscos de complicações macro e microvasculares característicos da doença (SBD, 2009; ADA, 2011).

## 2.2 FISIOPATOLOGIA DO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

Após a ingestão de uma alimentação rica em carboidratos, a elevação de glicose sanguínea promove a liberação de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas. A insulina quando ligada aos seus receptores promove uma cascata de sinalização a qual leva aos seus efeitos biológicos. Por outro lado quando o indivíduo é acometido pelo DM2, há uma deficiência na sinalização da insulina nos tecidos muscular e adiposo, e também em órgãos como o fígado e o pâncreas. Isso leva a resistência à insulina e disfunção das células  $\beta$  (RHODES; WHITE, 2002).

Os receptores de insulina estão presentes em todas as células, variando apenas em sua expressão. Os receptores consistem em duas subunidades  $\alpha$  extracelulares contendo o sítio de ligação à insulina e duas subunidades  $\beta$  com atividade tirosina quinase. Os resíduos destas subunidades  $\beta$  se autofosforilam quando ocorre a ligação da insulina e desencadeiam outras séries de fosforilações de diversas proteínas substrato do receptor de insulina (IRS). As IRS possuem uma importante função reguladora entre os receptores de insulina e os efeitos moleculares decorrentes da cascata de sinalização. Essas proteínas também estão envolvidas no crescimento de células somáticas, na ação da insulina em tecido muscular, adiposo e fígado, no crescimento e sobrevivência das células  $\beta$ -pancreáticas e ainda, desempenham função na ingestão de alimentos e reprodução (RHODES; WHITE, 2002). Quanto à regulação negativa da cascata de sinalização da insulina, esta pode ocorrer através da inativação das proteínas IRS por desfosforilação das cadeias laterais de tirosina. 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).

A obesidade quase sempre acompanha o DM2 e é um dos fatores apontados como causa de resistência à insulina. O aumento de massa dos

---

triglicerídeos armazenados no organismo leva a formação de adipócitos 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).

A redução da concentração de adiponectina é outro fator relacionado aos problemas com o DTM2. A adiponectina é uma proteína adiposeespecífica que quando reduzida diminui a sensibilização da insulina no fígado e tecido muscular. Além disso, outros agravantes podem ocorrer já que a adiponectina atua em diversas respostas metabólicas como inibição da lipólise, oxidação de ácidos graxos, supressão da gluconeogênese hepática e captação de glicose pelo músculo esquelético durante o exercício (STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005).

Pacientes com DTM2 também apresentam capacidade oxidativa comprometida e mitocôndrias de tamanho reduzido no tecido muscular esquelético (SHULMAN, 2000; STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005). A deterioração da secreção de insulina também é comum nesses pacientes, e o nível de severidade dessa condição pode agravar ao longo dos anos. A hiperglicemia resultante do DTM2 também leva a formação de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, fato que leva ao comprometimento de diversos componentes celulares das células  $\beta$  (STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005).

O acúmulo de coenzima A pela presença da glicose também é um problema relacionado ao DTM2. O excesso dessa coenzima reduz a secreção de insulina pelos mecanismos de abertura dos canais de potássio das células  $\beta$ , desacoplamento da proteína-2 reduzindo a formação de adenosino trifosfato (ATP) e pela indução de apoptose através de ácidos graxos ou síntese de óxido nítrico (STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005).

Além de tudo há também a deficiência na supressão da liberação do hormônio glucagon pelas células  $\alpha$ . Cabe lembrar que para manter a homeostase da glicose, há um equilíbrio entre a liberação de insulina e a supressão do glucagon. Como no DMT2 as células  $\alpha$  apresentam menor sensibilização pela glicose, os níveis de glucagon permanecem elevados contribuindo para a hiperglicemia típica da doença (GOKE, 2008).

---

### 2.3 DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

O diagnóstico do DMT2 é realizado através de pelo menos um dos seguintes critérios: o primeiro é a glicemia causal acima de 200 mg/dL, ou seja, a glicemia medida a qualquer horário do dia e independente das refeições; o segundo é a glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL e o terceiro é glicemia acima de 200 mg/dL duas horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose. Níveis de hemoglobina glicada (HbA1C) acima de 6,5% também são considerados para diagnóstico do DMT2. A HbA1C costuma ser o marcador principal da glicemia crônica, pois, reflete os níveis de glicose no sangue dos últimos 2 a 3 meses (ADA, 2011).

### 2.4 TRATAMENTO DO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

O início do tratamento do DMT2 ocorre com mudanças no estilo de vida, o que inclui alimentação balanceada e exercícios físicos. Porém, para a maioria dos pacientes uma simples mudança no estilo de vida não é suficiente para controlar a glicemia, sendo necessária terapia medicamentosa. Ela se inicia com a utilização de um único medicamento. No entanto, devido à cronicidade da doença e progressiva disfunção das células  $\beta$ , outras terapias utilizando mais de um fármaco podem ser introduzidas com o objetivo de controlar a doença. 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, 2007; BLONDE, 2010). As classes de antidiabéticos orais utilizados para o tratamento do DTM2 incluem as sulfoniluréias, glinidas, tiazolineodionas, inibidores de alfa-glicosidase, biguanidas e as gliptinas. Dentre essas as classes das biguanidas e gliptinas são as mais utilizadas.

Uma representante da classe das biguanidas é a metformina, a qual é recomendada como medicamento de primeira linha para o tratamento do DMT2 (NATHAN *et al.*, 2009). Ela reduz a produção hepática de glicose e a glicemia de jejum promovendo o aumento da sensibilização à insulina. A metformina também

---

reduz os níveis de HbA1C (1 a 2%), triacilglicerídeos e LDL colesterol. A ausência de hipoglicemia e a neutralidade ou pequena perda de peso ponderal também são vantagens da metformina frente aos demais tratamentos (CEFALU, 2007; CAMPBELL, 2009; NATHAN *et al.*, 2009).

A principal representante da classe das gliptinas é a vildagliptina, que atua inibindo seletivamente a enzima dipeptil peptidase-4 (DPP4). Inibindo a DPP4, a sensibilização das células  $\beta$  à glicose é aumentada, e conseqüentemente há um aumento na secreção de insulina em função dos níveis de glicose sanguíneo. O mesmo acontece para as células  $\alpha$  que passam a ser mais sensíveis aos níveis de glicose, reduzindo a secreção de glucagon. Assim, a vildagliptina reduz tanto a glicemia de jejum quanto a pós-prandial (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 exibe 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 foram raramente observados quando a vildagliptina foi utilizada como terapia no DMT2 (CROXTALL; KEAM, 2008; MATHIEU, 2009).

## 2.5 ASSOCIAÇÃO METFORMINA E VILDAGLIPTINA

Os mecanismos de ação da metformina e da vildagliptina são complementares e permitem um eficiente controle glicêmico. Em um estudo conduzido com pacientes que receberam duas vezes ao dia a associação vildagliptina e metformina (50 + 850 mg) durante 52 semanas foi observado uma redução nos níveis de HbA1C de aproximadamente 0,44% em relação ao total. Os casos de hipoglicemia foram raros e não houve ganho significativo de peso nesses pacientes. O perfil lipídico de jejum também apresentou melhora quando a terapia combinada foi utilizada (FERRANNINI *et al.*, 2009; MATTHEWS *et al.*, 2010).

Quando a associação de metformina e vildagliptina foi avaliada em comparação à associação metformina e pioglitazona, foi observada uma redução

---

nos níveis de HbA1C de aproximadamente 0,9% e 1,0%, respectivamente. Estes resultados demonstram que o tratamento vildagliptina + metformina não é inferior ao tratamento pioglitazona + metformina. Entretanto, não houve ganho de peso quando a vildagliptina foi utilizada. 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 nos níveis de LDL-colesterol e HDL-colesterol, enquanto que o tratamento com pioglitazona apresentou aumento nos níveis de ambos (BOLLI *et al.*, 2008).

## 2.6 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA METFORMINA E DA VILDAGLIPTINA

A metformina (cloridrato de N,N-dimetil guanil guanidina, CAS 657-24-9) é um composto branco ou esbranquiçado livremente solúvel em água e praticamente insolúvel em acetona, éter e clorofórmio. O pKa de metformina é de 12,4 (básico) e o ponto de fusão pode variar entre 223 e 226 °C. A fórmula molecular da metformina é C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub> e o peso molecular é de 129,16364 g/mol. A massa exata e monoisotópica é de 129,101445 (NCBI, 2014).

A vildagliptina ((2S) -1 - [2 - [(3-hidroxi-1-adamantil) amino] acetil] pirrolidina-2-carbonitrila, CAS 274901-16-5) é um composto branco, ou ligeiramente amarelado, ou ainda pó cristalino ligeiramente acinzentado, com ponto de fusão de aproximadamente 150 °C. A vildagliptina é facilmente solúvel em água e em dimetilsulfóxido. O pKa da vildagliptina é 9,0 (fortemente básico) e 14,7 (fortemente ácido). A fórmula molecular é C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> e o peso molecular é de 303.3993 g/mol. A massa exata e monoisotópica é de 303.194677 (NCBI, 2014). As estruturas químicas da metformina, vildagliptina e dos seus padrões internos metformina composto relacionado B e pirantel são apresentadas na Figura 1.

---

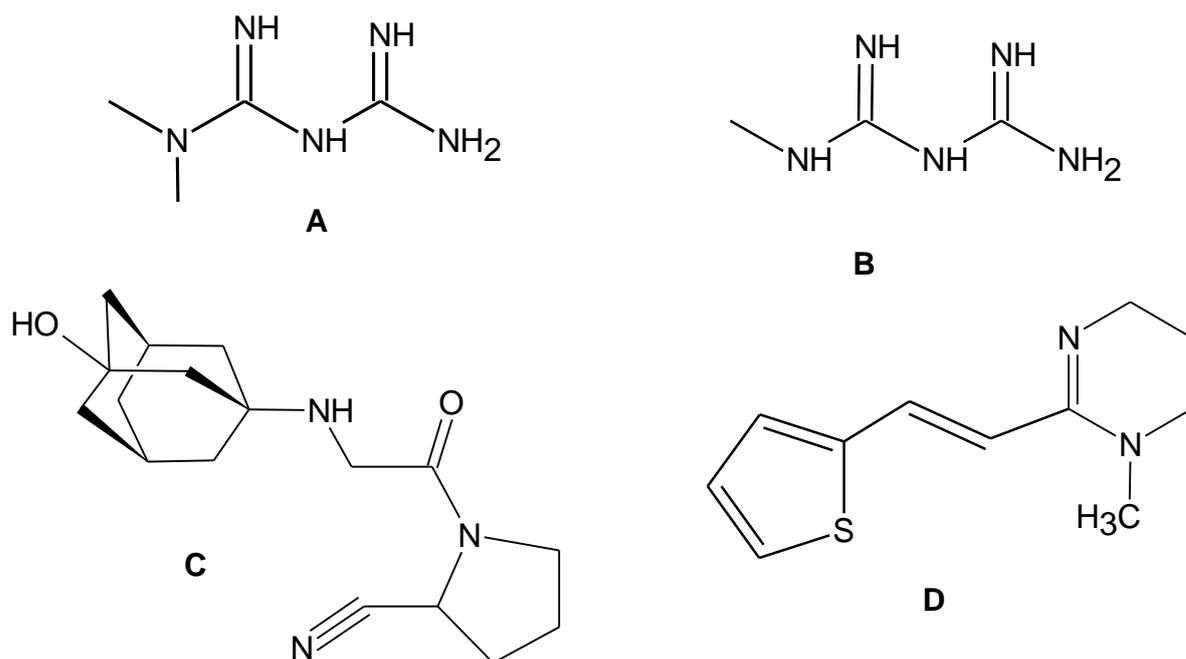


FIGURA 01. ESTRUTURAS QUÍMICAS DE (A) METFORMINA, (B) METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B, (C) VILDAGLIPTINA E (D) PIRANTEL

## 2.7 CLAE, ESPECTROMETRIA DE MASSAS E MÉTODOS PROPOSTOS PARA DETERMINAÇÃO DA METFORMINA E VILDAGLIPTINA EM PLASMA HUMANO

Nos últimos anos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) se tornou uma das técnicas de separação mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão na sensibilidade e na seletividade da técnica, com destaques em determinações ambientais, médicas e principalmente na indústria farmacêutica (TONHI *et al.*, 2002)

O princípio de separação do CLAE é baseado nas características físico-químicas de cada composto e uma ou mais interações entre o soluto e uma fase estacionária (CASS; DEGANI, 2001). Existem vários detectores para CLAE e a escolha do melhor depende da finalidade do estudo. Assim, parâmetros como alta sensibilidade, seletividade, rapidez de resposta, linearidade e estabilidade frente a mudanças de temperatura e composição da fase móvel caracterizam a escolha do detector. Os sistemas de detecção mais utilizados no CLAE são os detectores de arranjo de fotodiodos, fluorescência, índice de refração e o analisador de massas (EM). Este último tornou-se uma das ferramentas analíticas mais utilizadas nos últimos anos, pois o EM pode fornecer a massa molecular dos solutos e contribuir

com a elucidação estrutural de moléculas (CASS; DEGANI, 2001). Além disso, o acoplamento do CLAE com o EM (CLAE-EM) se tornou a técnica de quantificação mais comum em ensaios bioanalíticos, especialmente pela sua notável sensibilidade (WAL *et al.*, 2010).

Outra grande vantagem de se acoplar o CLAE a um analisador de massas - especialmente o do tipo triplo quadrupolo - está nos recursos de análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas e recursos *in tandem* (EM-EM). Devido a excelência na especificidade e na sensibilidade deste recurso, a espectrometria de massas teve um aumento considerável de aplicações nas últimas décadas, e se tornou a técnica analítica mais difundida em estudos em matriz biológica (CASS; DEGANI, 2001; KORFMACHER, 2005).

Para a determinação em plasma da vildagliptina, apenas dois métodos baseados em CLAE (PHARNE *et al.*, 2012) e CLAE-EM/EM (HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011) foram descritos na literatura. Entretanto, nenhum desses métodos monitora outros fármacos na matriz biológica.

Para a determinação da metformina, vários métodos foram descritos na literatura incluindo as técnicas de electroforese capilar (SONG *et al.*, 1998), CG (BROHON; NOEL, 1978; LENNARD *et al.*, 1978), CLAE (YUEN; PEH, 1998; CHENG; CHOU, 2001; TACHE *et al.*, 2001; ZARGHI *et al.*, 2003; AMINI; AHMADIANI; GAZERANI, 2005; BHAVESH *et al.*, 2007; YARDIMCI; OZALTIN; GURLEK, 2007; PORTA *et al.*, 2008; HUTTUNEN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; RANETTI *et al.*, 2009; GABR; PADWAL; BROCKS, 2010; GOPI *et al.*, 2012; CHHETRI; THAPAA; SCHEPDAELB, 2013; SIDDIQUIA *et al.*, 2013; RASHID *et al.*, 2014) e CLAE-EM/EM (CHEN *et al.*, 2004; KOSEKI *et al.*, 2005; GEORGITA *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2007; LIU; COLEMAN, 2009; GEORGITÃ *et al.*, 2010; SWALES; GALLAGHER; PETER, 2010; CHEN *et al.*, 2011; BONDE *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; POLAGANIA *et al.*, 2013). Em relação a estes métodos, algumas desvantagens foram apresentadas.

A electroforese capilar utiliza uma técnica de análise por campo amplificado, um sistema incomum para aplicação em análise de rotina (SONG *et al.*, 1998). Os métodos por CG necessitam de etapas de derivatização antes da injeção, fato que torna o preparo da amostra oneroso e laborioso (BROHON; NOEL, 1978; LENNARD *et al.*, 1978). Os métodos baseados em CLAE apresentam moderada

---

sensibilidade e seletividade quando aplicados a matrizes complexas, como o plasma, e assim tempos longos de corrida ou procedimentos complexos de pré-tratamento da amostra são necessários para garantir seletividade adequada do método. Nenhum dos métodos citados monitora a associação metformina e vildagliptina simultaneamente, justificando a necessidade deste trabalho.

## 2.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

Cada método analítico tem sua particularidade e está sujeito a efeitos da matriz e as variações provenientes das características de cada analito. Logo, para que a correta interpretação dos seus resultados seja alcançada, é primordial garantir a qualidade nas análises de modo que esses métodos sejam reproduzíveis e confiáveis (SHAH, 2007). Todavia, otimizações não garantem o desempenho de um método, sendo necessárias ações que demonstrem sua adequabilidade (IUPAC, 1995). Assim, é essencial que os princípios de validação dos métodos bioanalíticos sejam estabelecidos e aplicados de acordo com a orientação de órgãos regulamentadores (SHAH, 2007).

A definição dos parâmetros de validação, bem como as faixas de aceitação e os procedimentos a serem adotados encontram-se descritos em diversos guias de validação disponíveis na literatura, como por exemplo, o *Guidance for Industry* do *Food and Drug Administration* (FDA, 2013) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Por esse motivo apenas um breve resumo descrevendo cada parâmetro de validação será abordado nessa revisão.

- A) Seletividade: habilidade de um método analítico de diferenciar e quantificar os compostos em estudo de outros componentes que possam estar presentes na matriz biológica (metabólitos, medicamentos, produtos de degradação, nicotina e cafeína) (BRASIL, 2012). Em métodos instrumentais de separação a seletividade é a garantia de que os resultados obtidos não sejam prejudicados pela presença de interferentes da amostra;
-

- B) Efeito residual: O efeito residual é gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (BRASIL, 2012). Trata-se então, de um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte em função de contaminações;
- C) Efeito matriz: O efeito matriz é o efeito na resposta do analito ou padrão interno causado pela co-eluição de componentes residuais da matriz, que afetam a eficiência da ionização ou detecção das moléculas alvo (supressão ou elevação de sinal). Avaliar esse parâmetro é de suma importância para evitar a expressão de falsos resultados (PATEL, 2011; BRASIL, 2012);
- D) Limite de detecção: O limite de detecção (LD) é denominado como sendo a menor concentração de uma dada substância que o procedimento analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP, 2007). Para procedimentos analíticos instrumentais que demonstram o ruído da linha de base (caso do CLAE-EM/EM), o LD é determinado através da relação sinal-ruído, comparando a medição dos sinais do composto de interesse em baixas concentrações em relação a um branco. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de duas a três vezes o ruído da linha de base (INMETRO, 2003; USP, 2007);
- E) Limite inferior de quantificação: O limite inferior de quantificação (LIQ) é estabelecido por meio da análise da matriz biológica contendo a menor concentração do analito quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. O LIQ pode ser determinado por meio da relação sinal/ruído de 10 vezes a altura do ruído da linha de base (BRASIL, 2012);
- F) Linearidade: A linearidade é definida como a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (FDA, 2013). A validação quanto a este parâmetro deve garantir um máximo de precisão e exatidão nos resultados, parâmetros esses monitorados através das amostras de controle de qualidade (CQ). As CQ nada mais são do que amostras de matriz
-

adicionada do analito em concentração específica, utilizadas para validar e monitorar o desempenho de um método bioanalítico (BRASIL, 2012). Os níveis de concentração das CQ monitoradas em ensaios bioanalíticos são:

- Amostra de controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz adicionada do analito em concentração até três vezes o limite inferior de quantificação do método;
- Amostra de controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz adicionada do analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação do método;
- Amostra de controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz adicionada do analito em concentração entre 75 e 85% da maior concentração da curva de calibração;
- Amostra de controle de qualidade de diluição (CQD): amostra de matriz adicionada do analito em concentração acima da maior concentração da curva de calibração, analisada por meio de procedimento e proporção de diluição especificada pelo laboratório analítico;

G) Precisão: A precisão representa a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz (BRASIL, 2012). A importância desse parâmetro está em avaliar os erros aleatórios produzidos pelo novo método, de modo que sejam uniformemente distribuídos em torno de certo valor;

H) Exatidão: A exatidão de um método analítico é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico (BRASIL, 2012). Este parâmetro constitui uma das chaves para o propósito da validação, pois avalia o erro sistemático promovido em toda etapa analítica;

I) Recuperação: O parâmetro de recuperação mede a eficiência do processo de extração. Este parâmetro corresponde à percentagem do analito extraído da

---

matriz biológica fortificada em diferentes níveis de concentração, dentro de um limite de variação. Valores desejáveis de recuperação encontram-se próximos de 100%, mas admitem-se valores menores desde que a recuperação seja precisa e exata (BRASIL, 2003);

- J) Estabilidade do analito em matriz biológica e em solução: O ensaio de estabilidade deve ser realizado para verificar se a concentração do analito a ser determinada na amostra permaneceu estável durante o tempo do estudo. A instabilidade das drogas, seus metabólitos ou ainda das pró-drogas é um dos principais problemas relativos às amostras biológicas, e, por isso, monitorar o comportamento da substância de interesse tanto em solução quanto na matriz biológica é de fundamental importância para evitar a subestimação ou a superestimação da sua concentração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Os problemas de estabilidade podem ocorrer em qualquer etapa de um procedimento analítico (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009), mas em geral se relacionam com as condições de armazenamento, presença de enzimas, pH, anticoagulante, ciclos de descongelamento, luz, e pelas propriedades químicas do analito, da matriz e do recipiente de armazenamento (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; BRASIL, 2012). Dessa forma, o ensaio de estabilidade deve reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras, e não pode ser extrapolado se houver qualquer mudança na conduta de um ensaio bioanalítico (BRASIL, 2012).

## 2.9 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO APLICADOS EM ENSAIOS BIOANALÍTICOS

### 2.9.1 Extração por precipitação de proteínas

O método de extração por precipitação de proteínas é um dos mais utilizados como pré-tratamento de amostras de soro ou plasma (FLANAGAN; MORGAN; SPENCER, 2006; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Esta técnica é simples, rápida, de baixo custo e sua aplicação abrange compostos tanto hidrofílicos quanto

---

hidrofóbicos (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). O princípio consiste na adição de agentes precipitantes na amostra biológica, seguido de agitação e centrifugação. Por fim, o sobrenadante é analisado (FLANAGAN; MORGAN; SPENCER, 2006). Entre os agentes precipitantes encontram-se ácidos, solventes orgânicos, sais e íons metálicos. Esses agentes propiciam uma desnaturação da proteína plasmática e, desta forma, ocorre o rompimento entre a ligação da proteína com o composto de interesse, liberando este último para a fase líquida da mistura, podendo, após um processo de centrifugação, ser analisada (POLSON *et al.*, 2003).

Os solventes orgânicos utilizados como agentes precipitantes diminuem a constante dielétrica entre as proteínas do plasma. Isto gera um aumento de atração entre as moléculas carregadas facilitando as interações eletrostáticas entre as proteínas. Como consequência, ocorre uma agregação entre essas proteínas e sua precipitação (POLSON *et al.*, 2003).

Quando um ácido é utilizado como agente precipitante em uma matriz biológica, como o plasma, deixando o pH do meio abaixo do ponto isoelétrico das proteínas. Assim, são formados sais insolúveis com grupos amino carregados positivamente e, dessa forma, precipitam (POLSON *et al.*, 2003).

Altas concentrações de sais adicionadas ao plasma absorvem moléculas de água, diminuindo a disponibilidade desta às proteínas. Gera-se um aumento de interação das regiões hidrofóbicas das proteínas, levando a agregação e precipitação (POLSON *et al.*, 2003). Já a carga positiva dos íons metálicos diminui a solubilidade das proteínas plasmáticas por modificar seus pontos isoelétricos. Além disso, os íons metálicos competem com os prótons  $H^+$  por ligações com os aminoácidos das proteínas. Com o aumento de prótons no meio, há uma diminuição do pH. Esse resultado junto com a diminuição da solubilidade promove a precipitação das proteínas plasmáticas (POLSON *et al.*, 2003).

Apesar das vantagens da técnica de extração por precipitação de proteínas, é importante lembrar que o sobrenadante contém uma grande quantidade de componentes remanescentes do plasma. Estes, por sua vez, podem diminuir a seletividade do método ou causar supressão do sinal no espectrômetro de massas. Além da precipitação das proteínas também pode ocorrer a precipitação dos compostos de interesse e, conseqüentemente, a redução da recuperação dos mesmos (MA *et al.*, 2008). Algumas vezes, é necessário o uso de filtros para

---

melhorar o pré-tratamento do extraído, e isto também diminui a recuperação dos analitos. Embora tenha estas desvantagens, a precipitação de proteínas continua sendo utilizada em ensaios bioanalíticos, pois é a técnica mais simples de extração para este tipo de análise (FLANAGAN; MORGAN; SPENCER, 2006).

### 2.9.2 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é uma técnica muito popular no que diz respeito às etapas de preparação e pré-concentração de amostras biológicas (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). A técnica é baseada no particionamento da amostra entre líquidos de duas fases imiscíveis, onde uma das fases é aquosa e a outra um solvente orgânico (WAL *et al.*, 2010). Na extração líquido-líquido os compostos mais hidrofílicos preferem a fase aquosa enquanto que os hidrofóbicos a fase orgânica. Dessa forma, os analitos extraídos pela fase orgânica são facilmente recuperados através da evaporação do solvente, enquanto que os remanescentes da fase aquosa podem ser injetados diretamente no CLAE (WAL *et al.*, 2010).

Este tipo de extração tem a vantagem de ser bastante simples, mas algumas desvantagens como a formação de emulsões podem dificultar o seu uso. Em alguns casos também é necessário utilizar uma grande quantidade de solvente orgânico (muitas vezes tóxicos), o que torna a técnica prejudicial para o meio ambiente (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Em relação aos custos da utilização da extração líquido-líquido, a literatura é bastante controversa, mas a técnica é uma das mais utilizadas em ensaios bioanalíticos, dada sua rapidez e capacidade de recuperação (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009; WAL *et al.*, 2010).

### 2.9.3 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas de extração mais desenvolvidas e populares da bioanálise, fato esse atribuído à sua grande

---

seletividade e efetividade na recuperação de analitos a partir de matrizes complexas (BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004; WAL *et al.*, 2010).

Na SPE o analito de interesse é particionado entre uma fase líquida (amostra) e uma fase estacionária, em geral adsorventes à base de sílica, fases quimicamente ligadas à sílica, polímeros e seus derivados (CIOLA, 1998; KATAOKA, H., 2003). Os cartuchos de fase estacionária são disponibilizados na forma de seringas (CIOLA, 1998; KATAOKA, H., 2003) ou pipetas contendo suporte para fase estacionária, também conhecida como pipetas de extração (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

Na SPE a substância de interesse é eluída por uma fase estacionária sólida, onde o analito fica retido de acordo com o grau de afinidade por essa fase. A partir de então os interferentes podem ser eluídos ou lavados, minimizando a presença de substâncias indesejadas na fração final do extrato (WAL *et al.*, 2010). Todavia, para que a extração aconteça de forma efetiva, é necessário que o analito tenha uma afinidade maior pela fase estacionária do que pela matriz (KATAOKA, H. , 2003); em outras palavras, a escolha correta do adsorvente é o ponto-chave para que a extração aconteça de forma seletiva (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009).

O uso de SPE apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de utilizar quantidade apropriada de amostra de acordo com o tipo de dispositivo. O sistema também necessita de aparato adequado e cuidados na velocidade de eluição da amostra. Além de tudo, os dispositivos aplicados em ensaios biológicos são descartáveis, o que torna a técnica onerosa (NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Em contrapartida, o sistema utiliza pouco solvente orgânico comparado com extração líquido-líquido e não forma emulsões (KATAOKA, H. , 2003; BLAHOVÁ; BRANDSTETEROVÁ, 2004).

---

---

### ***3. MATERIAL E MÉTODOS***

---

### 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA, REAGENTES, PADRÕES ANALÍTICOS E ESPECIALIDADE FARMACÊUTICA

As amostras de plasma hemolisado (plasma contendo hemácias lisadas), plasma lipêmico (plasma com alto teor de lipídios) e plasma normal (plasma não lipêmico e não hemolisado) utilizadas durante o desenvolvimento e a validação dos métodos foram gentilmente cedidos pela Hemepar-PR (Curitiba, Brasil).

O ácido fórmico (88%) foi obtido da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda) enquanto que o metanol e a acetonitrila (ambos grau CLAE) foram adquiridos da Tedia (Fairfield, EUA). O formiato de amônio (99%) foi obtido da Acros Organics (Nova Jersey, EUA) enquanto que a água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, EUA). As amostras comerciais de Glifage<sup>®</sup> (cloridrato de metformina 850 mg, Merck Corporation), Galvus<sup>®</sup> (vildagliptina 50 mg, Novartis) e Galvus Met<sup>®</sup> (vildagliptina 50 mg + cloridrato de metformina 850 mg, Novartis) foram obtidas no comércio local (Curitiba, Brasil).

O padrão analítico de metformina (99,7%) e seu respectivo padrão interno (PI) metformina composto relacionado B (cloridrato de 1-metilbiguanida, 100,0%) foram adquiridos da Farmacopéia Americana (Rockville, EUA). O padrão de vildagliptina (98,0%) foi obtido da Ontario Chemicals (Guelph, Canadá) enquanto que o seu respectivo padrão interno pamoato de pirantel (96,7%) foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). A estrutura química de cada composto e as características físico químicas são apresentadas na Seção 2.6).

### 3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque de metformina, vildagliptina e dos padrões internos metformina composto relacionado B e pamoato de pirantel foram preparadas, separadamente, em metanol:acetonitrila (50:50 v/v) de modo a obter uma concentração final de 1 mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com a necessidade de cada experimento através de diluição apropriada das soluções estoque em acetonitrila. As soluções estoque e de trabalho foram mantidas sob-refrigeração a 4 °C em frasco de vidro âmbar.

---

### 3.3 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B, e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Milford, EUA), que durante as análises foi mantido a temperatura ambiente. Uma mistura de acetonitrila:metanol (50:50 v/v) foi utilizada como solvente de limpeza no gerenciador de amostras.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems, Toronto, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, South Natick, EUA) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

Para o monitoramento em plasma da metformina, vildagliptina e padrões internos os seguintes parâmetros foram ajustados:

- Fase móvel: Isocrática composta de 20% de água e 80% de solução acetonitrila:água (95:5 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 3 mM de formiato de amônio.
  - Fluxo da fase móvel: 400 µL/min;
  - Coluna: Atlantis HILIC Silica 150 x 2,1 mm, 3 µm de tamanho de partícula (Waters Corporation, Milford, EUA);
  - Temperatura de forno da coluna: 40 °C;
  - Volume de injeção: 5 µL;
  - Fonte de ionização: ESI operada no modo positivo de ionização;
  - Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): 5500 V, temperatura: 450 °C, gás de interface (CUR): 10 psi, gás de colisão (CAD): 4 psi, gás de nebulização (GS1): 50 psi e gás auxiliar (GS2): 45 psi;
  - Aquisição dos dados: Monitoramento de reações múltiplas (MRM) com *dwell time* de 300 ms;
  - Parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto: De acordo com o descrito na Tabela 01.
-

TABELA 01 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO EM PLASMA DA METFORMINA, VILDAGLIPTINA, METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B (MetB) E PIRANTEL

Modo de ionização	Compostos	Íon Molecular (m/z)	Transição monitorada (m/z)	CE <sup>a</sup> (eV)	CEP <sup>b</sup> (V)	CXP <sup>c</sup> (V)	DP <sup>d</sup> (V)	EP <sup>e</sup> (V)
Positivo [M+H] <sup>+</sup>	Metformina	130,1	130,1 → 60,2*	17	10	4	31	7,5
			130,1 → 71,1	27	10	4	31	7,5
	Vildagliptina	304,1	304,1 → 154,1*	21	14	4	36	7,5
			304,1 → 97,1	39	14	4	36	7,5
	Pirantel (PI)	207,2	207,2 → 150,2*	37	12	4	46	8,0
			207,2 → 136,2	39	12	4	46	5,0
	MetB (PI)	116,1	116,1 → 60,0*	17	12	4	31	9,0
			116,1 → 57,1	29	12	4	31	9,0

<sup>a</sup>CE, energia de colisão; <sup>b</sup>CEP, potencial de entrada na cela de colisão; <sup>c</sup>CXP, potencial de saída da cela de colisão; <sup>d</sup>DP, potencial de desagrupamento; <sup>e</sup>EP, potencial de entrada; \*transições utilizadas para quantificação; PI: padrão interno.

O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados através do software Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

### 3.4 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAIR DO PLASMA OS ANALITOS E OS PADRÕES INTERNOS

Com o intuito de avaliar qual a melhor forma de extrair do plasma os analitos e os padrões internos, diferentes métodos de extração foram testados, incluindo extração em fase sólida e precipitação de proteínas com acetonitrila, metanol e acetonitrila ou metanol acidificados (0,1% ácido fórmico).

Para condução dos ensaios, alíquotas de 200 µL de plasma branco (plasma livre dos analitos de interesse) foram transferidas para tubos de *Eppendorf*, e em

seguida fortificadas com 50 µL da solução de trabalho dos analitos, e 50 µL da solução de trabalho dos padrões internos, de modo a obter 100,0 ng/mL de cada composto, cada nível contendo 350 ng/mL de metformina composto relacionado B (PI) e 250 ng/mL de pirantel (PI). Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 2 min, e submetidas aos seguintes procedimentos:

- Precipitação de proteínas: Uma alíquota de 1,7 mL do agente precipitante (acetonitrila, metanol, acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico ou metanol contendo 0,1 % ácido fórmico) foi adicionada ao tubo de *Eppendorf* contendo a amostra de plasma fortificada. A amostra foi agitada em vórtex por 3 min e em seguida submetida à centrifugação por 10 min (14000 rpm, -5 °C, *Eppendorf* 5810R, Hamburg, Alemanha). O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de politetrafluoretileno (PTFE) 0,22 µm de poro (VertiPure, Jatujak, Tailândia).
- Extração em fase sólida: A amostra de plasma fortificada foi transferida para um cartucho de extração Oasis HLB de 3mL (Waters Corporation, Mildford, EUA) previamente condicionado com 2 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. Após a eluição da amostra pelo cartucho, a fase estacionária lavada com 2 mL de água ultrapura. A recuperação dos analitos foi realizada com 1 mL de acetonitrila. O eluato foi todo evaporado em um concentrador de amostras (40 °C), e o resíduo remanescente foi ressuspenso com 200 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v), mediante agitação em vórtex por 3 min.

Os ensaios foram conduzidos em sextuplicata, sendo definido o melhor procedimento de extração aquele que apresentou a maior recuperação dos analitos com desejada reprodutibilidade.

### 3.5 PREPARO DA AMOSTRA PARA O ESTUDO DE VALIDAÇÃO

As amostras de plasma utilizadas no estudo de validação foram pré-tratadas utilizando a técnica de precipitação de proteínas. Para tanto, uma alíquota de 1700,0

---

$\mu\text{L}$  de acetonitrila (contendo 0,1% de ácido fórmico) foi adicionada aos tubos de *Eppendorf* contendo as amostras de plasma (fortificadas ou não). As amostras foram agitadas em vórtex (3 min) e centrifugadas por 10 min (14.000 rpm,  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de PTFE (0.22  $\mu\text{m}$  de poro) antes da injeção no sistema CLAE-EM/EM.

### 3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método por CLAE-EM/EM desenvolvido neste estudo foi validado de acordo com os critérios estabelecidos no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012), e de acordo com as diretrizes do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do *Food and Drug Administration* (FDA, 2013). De acordo com esses guias, os seguintes requisitos devem ser atendidos para que um método bioanalítico seja considerado adequado para sua finalidade: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão, efeito residual, efeito matriz, recuperação e estabilidade dos analitos em matriz biológica e em solução.

#### 3.6.1 Limite de detecção e limite inferior de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ) foram estimados através da relação sinal-ruído. Para condução desse estudo, três alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma branco foram fortificadas com soluções dos analitos de modo a obter 100 ng/mL de cada composto. As amostras foram agitadas em vortex por 3 min e em seguida submetidas à pré-tratamento, conforme descrito no ítem 3.5. As amostras extraídas foram diluídas sucessivamente com acetonitrila e injetadas no CLAE-EM/EM. O LD foi estimado através da relação sinal/ruído de 3:1 enquanto que o LIQ foi estimado pela relação sinal:ruído de pelo menos 10:1, até que desejada precisão fosse alcançada ( $\text{CV} < 20\%$ ). Os cálculos de LD e LIQ foram realizados automaticamente pelo software *Analyst* versão 1.4.2.

---

### 3.6.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada através do método da comparação da matriz. Com o objetivo de investigar uma possível interferência dos componentes endógenos nos mesmos tempos de retenção dos analitos e padrões internos (Pis), alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila/água (70:30 v/v) foram adicionadas a tubos de *Eppendorf* contendo, separadamente, uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  de plasma hemolisado, uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  de plasma lipêmico e quatro amostras de 200  $\mu\text{L}$  de plasma normal (todas obtidas de fontes distintas). As amostras foram agitadas em vórtex por 3 min e em seguida submetidas a pré-tratamento conforme descrito na Seção 3.5.

Em uma segunda etapa, alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma normal foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução dos padrões internos, de modo a obter uma concentração conhecida de 5 ng/mL de metformina, 5 ng/mL de vildagliptina, 350 ng/mL de metformina composto relacionado B (PI) e 250 ng/mL de pirantel (PI).

As amostras fortificadas foram homogeneizadas em vórtex por 3 min e em seguida submetidas a pré-tratamento, conforme descrito na Seção 3.5. Os cromatogramas obtidos com as matrizes isentas dos analitos de interesse foram sobrepostos aos cromatogramas obtidos com o plasma fortificado. As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% da resposta do analito obtido com a matriz fortificada. As respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do PI devem ser inferiores a 5% da resposta do PI.

### 3.6.3 Linearidade

A linearidade foi determinada através do método da padronização interna. O estudo foi conduzido durante três dias consecutivos e as curvas analíticas foram preparadas em triplicata, em nove níveis de concentração. A análise de duas amostras brancas (plasma livre dos analitos de interesse) e duas amostras zero (plasma branco contendo o padrão interno) foi incluída a cada dia de estudo.

---

Para o preparo das curvas de calibração, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos e 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter os seguintes níveis de concentração 5; 12,5; 25; 37,5; 50; 125; 250; 375 e 500 ng/mL de cada analito, cada nível contendo 350 ng/mL de metformina composto relacionado B (PI) e 250 ng/mL de pirantel (PI). As amostras fortificadas foram submetidas a pré-tratamento utilizando a técnica de precipitação de proteínas, conforme descrito na Seção 3.5.

Para cada composto uma curva de calibração foi gerada a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos/áreas dos picos dos padrões internos *versus* a concentração dos analitos/concentração dos padrões internos. As curvas de calibração foram construídas através do método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear  $1/x \cdot x$ . O ângulo, o intercepto e o coeficiente de correlação (r) foram calculados como parâmetros da regressão. Para cada composto e em cada nível de concentração, foram calculados o coeficiente de variação (CV%) e o erro relativo (ER%) com a finalidade de monitorar os ajustes de precisão e a exatidão dos dados. Nesse caso as variações de precisão e exatidão não devem exceder 15%, exceto para o LIQ o qual não deve apresentar variações maiores do que 20%. O coeficiente de correlação (r) deve ser igual ou superior a 0,98.

#### 3.6.4 Amostras de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade (CQ) do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ), e as de baixa (CQB), média (CQM) e alta concentração (CQA) foram preparadas de maneira similar às amostras da curva de calibração (item 3.6.3), porém em oito réplicas, de acordo com as concentrações descritas na Tabela 2. O critério de aceitação das CQs é determinado pela obtenção de ao menos 66% dos controles com desvio inferior a 15% comparado ao valor nominal da curva de calibração, exceto para o LIQ o qual não deve apresentar variações maiores do que 20% (BRASIL, 2012).

A única amostra de CQ preparada de maneira distinta às amostras da curva de calibração foi a amostra de controle de qualidade de diluição (CQD). O preparo da CQD consistiu na fortificação de oito alíquotas de 200 µL de plasma branco com

---

50 µL da solução dos analitos, de modo a obter uma concentração de 1000,0 ng/mL de metformina e vildagliptina. As amostras fortificadas foram diluídas 1:10 v/v com plasma branco e em seguida agitadas em vórtex por 3 min. Uma alíquota de 200 µL da amostra diluída foi transferida para um tubo de *Eppendorf*, e fortificada com 50 µL de acetonitrila e 50 µL da solução dos padrões internos de modo a obter uma concentração de 350 ng/mL de metformina composto relacionado B e 250 ng/mL de pirantel. As amostras foram novamente agitadas (vórtex, 3 min), processadas (item 3.5) e analisadas. Para a CQD não são admitidos erros de precisão maiores do que 15% entre as réplicas das amostras diluídas, bem como erros de exatidão superiores a 15% do valor nominal de fortificação (BRASIL, 2012).

TABELA 2 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Compostos	Nível de concentração das amostras de controle de qualidade	Concentração (ng/mL)
Metformina	CQ-LIQ	5,0
	CQB	12,5
	CQM	100,0
	CQA	375,0
	CQD	100,0**
Vildagliptina	CQ-LIQ	5,0
	CQB	12,5
	CQM	100,0
	CQA	375,0
	CQD	100,0**
Metformina composto relacionado B*	-	350,0
Pirantel*	-	250,0

Dados: CQ-LIQ: controle de qualidade do limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição; \*Padrão interno; \*\*Valor nominal após diluição de 10 vezes.

### 3.6.5 Efeito residual

O teste de efeito residual consistiu de injeções alternadas de uma triplicata de brancos de plasma e uma triplicata de amostras de plasma fortificadas nos níveis mais altos de concentração da curva de calibração (item 3.6.3). A resposta do pico

interferente no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do CQ-LIQ (Seção 3.6.4). A resposta do pico interferente no tempo de retenção do PI deve ser inferior a 5 % (cinco por cento) da resposta do PI (BRASIL, 2012).

### 3.6.6 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão foram estimadas durante três dias consecutivos (intra e inter-dia) através da análise de oito réplicas de amostras controle (CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD) preparadas conforme descrito na seção 3.6.4.

A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as áreas obtidas de cada composto, em um mesmo nível de concentração. O cálculo do coeficiente de variação é apresentado na Equação 1.

A exatidão foi estimada em cada nível de concentração através cálculo do erro relativo (ER%) obtido entre a concentração teórica e a concentração experimental de cada composto (Equação 2). Os erros de precisão e exatidão devem ser inferiores a 15%, exceto para o CQ-LIQ onde as variações não devem exceder 20% (BRASIL, 2012).

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad \text{Equação (1)}$$

$$ER\% = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{nom}}}{C_{\text{nom}}} \times 100, \quad \text{Equação (2)}$$

onde  $C_{\text{exp}}$  é a média da concentração obtida experimentalmente e  $C_{\text{nom}}$  é a concentração nominal ou real.

### 3.6.7 Teste de recuperação

Para realizar o teste de recuperação, um lote de oito amostras controle foi preparado (item 3.6.4) em dois níveis de concentração (CQB e CQA). Esse conjunto de amostras foi denominado de “lote 1”.

Em seguida, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com 100 µL de acetonitrila/água (70:30 v/v), agitadas (vórtex 3 min), e submetidas a pré-tratamento conforme descrito na Seção 3.5. Uma alíquota de 950 µL do sobrenadante foi transferida para um tubo de Eppendorf (2mL) e fortificado com 25 µL da solução dos analitos e 25 µL da solução de padrão interno, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do lote 1 (CQB e CQA). Esse conjunto de amostras foi denominado de “lote 2”.

A recuperação foi estimada em percentagem, através da razão entre a quantidade do analito encontrada nas amostras de plasma do lote 1 (analito extraído) e a quantidade do analito encontrada nas amostras de plasma do lote 2 (analito não extraído, considerado 100%). O cálculo da recuperação é apresentado na Equação 3.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração do analito extraído}}{\text{Concentração do analito não extraído}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

### 3.6.8 Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz na resposta dos analitos e PIs, primeiramente foram adicionados 1700,0 µL de agente precipitante (acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico) em tubos de *Eppendorf* contendo 200 µL de plasma (quatro amostras normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas). As amostras foram agitadas (vórtex, 3 min) e centrifugadas por 10 min (14.000 rpm, 5 °C). Uma alíquota de 450 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo de *Eppendorf* o qual recebeu

---

alíquotas de 25 µL de solução dos analitos e 25 µL da solução do PI, de modo a obter os mesmos níveis de concentração do CQB e CQA (item 3.6.4).

Para cada nível de concentração foi calculado o fator de matriz normalizado (FMN, Equação 4) das respostas obtidas com os analitos em plasma e em solução, preparada nos mesmos níveis de concentração. O efeito da matriz não é significativo quando a variação (CV%) dos fatores de matrizes normalizados relativos a todas as concentrações de um mesmo analito for inferior a 15% (BRASIL, 2012).

$$\text{FMN} = \frac{\frac{\text{Resposta do analito em matriz}}{\text{Resposta do PI em matriz}}}{\frac{\text{Resposta do analito em solução}}{\text{Resposta do PI em solução}}} \quad \text{Equação (4)}$$

### 3.6.9 Teste de supressão iônica

O estudo do aumento ou supressão do sinal foi conduzido através do preparo de três lotes de amostras controle preparadas no nível médio de concentração (CQM, ver ítem 3.6.4). O lote 1 continha os analitos (A), o lote 2 continha os respectivos padrões internos de cada analito (B) e o lote 3 continha ambos, analitos e PIs (A+B). O estudo foi conduzido em sextuplicata, utilizando plasmas de fontes distintas. O cálculo do nível de supressão/aumento do sinal foi calculado de acordo com o descrito na Equação 05.

$$\text{Aumento/supressão iônica relativa (\%)} = 100 * [(Y/X) - 1], \quad \text{Equação (5)}$$

onde X é a área dos picos dos analitos (A) ou PIs (B) injetados separadamente (conjunto 1 ou 2), e Y é a área dos picos dos analitos e PIs injetados simultaneamente (conjunto 3, A+B). Resultados acima de zero indicam a

percentagem de aumento do sinal e resultados abaixo de zero indicam a percentagem da supressão iônica (REMANE *et al.*, 2010). A média das áreas dos picos dos analitos e Pis (conjunto 1 ou 2) também foram testados quanto à diferenças estatisticamente significativas em relação aos valores do conjunto 3. A significância foi testada utilizando teste t de Student bicaudal pareado com significância de 95%.

### 3.6.10 Teste de estabilidade

#### 3.6.10.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em matriz biológica sob as condições normais de trabalho do laboratório. Para a condução deste ensaio, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com 50 µL da solução dos analitos, de modo a obter uma concentração final de 12,5 e 750 ng/mL de metformina e vildagliptina. As amostras fortificadas foram agitadas (vórtex, 2 min) e em seguida mantidas sobre a bancada por 6 h a temperatura ambiente controlada (aproximadamente 21 °C). Após este período, as amostras receberam alíquotas 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter, em cada nível de concentração, 350 ng/mL de metformina composto relacionado B e 250 ng/mL de pirantel. As amostras foram novamente agitadas (vórtex, 3 min) e submetidas a etapa de pré-tratamento, conforme descrito na Seção 3.5.

Os resultados obtidos com as amostras armazenadas na bancada foram comparados com a média dos valores das amostras de plasma recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012). O ensaio foi conduzido utilizando oito (08) réplicas preparadas para cada nível de concentração.

---

### 3.6.10.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade dos analitos também foi determinada em matriz biológica após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando oito (08) alíquotas de 200 µL de plasma branco, fortificadas nos mesmos níveis de concentração da estabilidade de curta duração (item 3.6.10.1). As amostras fortificadas foram congeladas por 24 h (-40 °C) e então descongeladas a temperatura ambiente (1º ciclo). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas (-40 °C) por mais um período de 24 h, e assim sucessivamente até completar 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

Após o terceiro ciclo de descongelamento, as amostras foram fortificadas com 50 µL da solução dos padrões internos, de modo a obter em cada nível de concentração 350 ng/mL de metformina composto relacionado B e 250 ng/mL de pirantel. As amostras foram agitadas em vórtex (3 min) e submetidas a etapa de pré-tratamento, conforme descrito na Seção 3.5.

Os resultados obtidos com as amostras do ciclo de congelamento e descongelamento foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15%.

### 3.6.10.3 Estabilidade de longa duração

Para avaliar a estabilidade de longa duração, alíquotas de 200 µL de plasma branco foram fortificadas com solução dos analitos, de modo a obter os mesmos níveis de concentração da estabilidade de curta duração (item 3.6.10.1). Após a fortificação, as amostras de plasma foram agitadas (vórtex, 3 min), e em seguida congeladas (-40 °C) por um período de 15 dias (período que excedeu o tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra do voluntário e a análise da última). Após este período, as amostras foram descongeladas e fortificadas com 50 µL da solução dos padrões internos (350 ng/mL de metformina composto

---

relacionado B e 250 ng/mL de pirantel). As amostras foram agitadas em vórtex por 3 min e então submetidas a etapa de pré-tratamento, conforme descrito na Seção 3.5.

Cada nível de concentração foi avaliado utilizando oito (08) réplicas de amostras, sendo os resultados obtidos com as amostras armazenadas em freezer (15 dias) comparados com a média dos valores obtidos com amostras de plasma recém-preparadas no mesmo nível de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

#### 3.6.10.4 Teste de estabilidade pós-processamento

O teste de estabilidade de pós-processamento foi avaliado em matriz biológica, utilizando amostras controle preparadas no nível CQB e CQA (item 3.6.4). As amostras foram mantidas no injetor automático do CLAE-EM/EM por 24 h (20 °C, vial transparente) e em seguida injetadas. Os resultados obtidos com as amostras armazenadas no injetor automático foram comparados com a média dos valores obtidos com amostras de plasma recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 15% (BRASIL, 2012).

#### 3.6.10.5 Estabilidade das soluções estoque

A estabilidade das soluções estoque (1,0 mg/mL dos analitos e dos padrões internos) foi avaliada após 15 dias do armazenamento das soluções em refrigerador (4 °C, frasco âmbar). Decorrido os 15 dias, as soluções foram retiradas do refrigerador, misturadas e diluídas com acetonitrila/água (70:30 v/v), de modo a obter os mesmos níveis de concentração descritos no ensaio de estabilidade de pós-processamento (item 3.6.10.4). Os resultados obtidos com as soluções armazenadas no refrigerador foram comparados com a média dos valores obtidos com soluções recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração. O comparativo foi realizado através do ER% e CV%, os quais não devem exceder 10% (BRASIL, 2012).

---

### 3.6.10.6 Estabilidade das soluções de trabalho

A estabilidade das soluções de trabalho foi avaliada conforme procedimento descrito para as soluções estoque (item 3.6.10.5). No entanto, as soluções de trabalho permaneceram 6 h sobre a bancada (21 °C) antes das injeções.

## 3.7 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Os protocolos experimentais envolvendo seres humanos neste estudo foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (CAAE 10857012.0.0000.0102). Os voluntários foram informados sobre todos os procedimentos e possíveis riscos relacionados ao estudo, e após receberem todos os esclarecimentos, assinaram um termo de consentimento livre esclarecido antes de participar do estudo (Anexo 1).

## 3.8 VOLUNTÁRIOS, COLETA DE AMOSTRA E APLICAÇÃO DO MÉTODO

O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de plasma obtidas de seis voluntários (três mulheres e três homens, idade entre 48 a 62 anos). Após o almoço, dois voluntários receberam uma dose de Glifage® (cloridrato de metformina 850 mg), dois voluntários receberam uma dose de Galvus® (vildagliptina 50 mg), e dois voluntários receberam uma dose de Galvus Met® (vildagliptina 50 mg + cloridrato de metformina 850 mg). As amostras de sangue (3,0 mL) foram coletadas em três períodos após a administração dos medicamentos (1, 2 e 3 horas). O anticoagulante utilizado foi edetato de sódio. Todas as amostras foram imediatamente centrifugadas a 4000 rpm (5,0 min, temperatura ambiente), e o plasma foi dividido em alíquotas as quais foram congeladas a -40 °C até o momento das análises.

---

### 3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLASMA DOS VOLUNTÁRIOS

As amostras de plasma congeladas (-40 °C) dos voluntários foram descongeladas à temperatura ambiente controlada, e uma alíquota de 200 µL foi transferida para um tubo de *Eppendorf* de 2 mL. A alíquota foi fortificada com 50 µL de acetonitrila e 50 µL da solução de padrão interno, de modo a obter uma concentração final de 350 ng/mL de metformina composto relacionado B e 250 ng/mL de pirantel. As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex (3 min) e submetidas a etapa de pré-tratamento conforme descrito na Seção 3.5.

---

---

## ***4. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

#### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO HILIC-EM/EM

A primeira etapa para o desenvolvimento do método HILIC-EM/EM foi a checagem do sinal dos analitos. A fonte de ionização escolhida foi a *Electrospray* (ESI) que permite ionizar compostos de média a alta polaridade (caso de nosso estudo). Neste ensaio soluções de trabalho contendo 100 ng/mL dos analitos e dos padrões internos foram preparadas e infundidas separadamente no espectrômetro de massas. Foram avaliados o modo de ionização e a intensidade e a estabilidade do sinal de cada substância. Alguns ajustes de concentração das soluções foram realizados a fim de garantir uma intensidade de sinal adequada ( $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps) para otimização automática dos parâmetros individuais dos compostos via Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Ao término das otimizações o modo positivo de ionização foi o mecanismo mais eficiente para ionizar os analitos e os PIs. Foram por fim obtidos os dois fragmentos de íons mais intensos de cada composto, sendo o de maior intensidade utilizado para quantificação e o segundo maior em intensidade para qualificação do sinal analítico, como pode ser observado na figura 02.

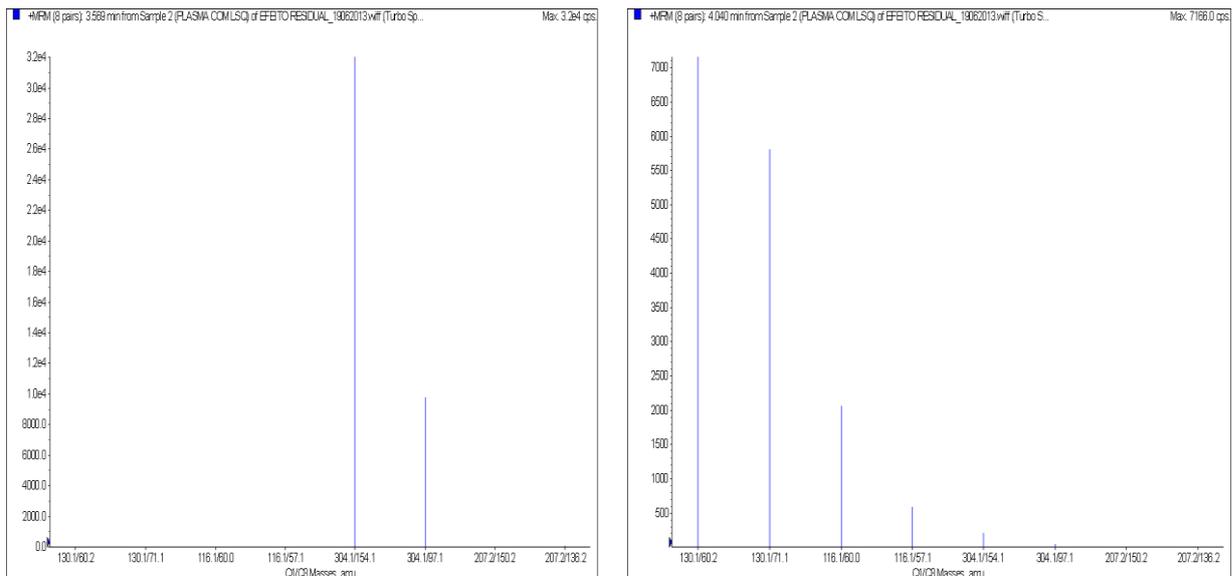


FIGURA 02: ESPECTROS DE MRM GERADOS PARA VILDAGLIPTINA E METFORMINA, RESPECTIVAMENTE.

A otimização dos parâmetros da fonte de ionização (CUR, CAD, ISV, GS1, GS2 e temperatura) foi realizada através de análises por injeção em fluxo (FIA), acoplando o CLAE ao espectrômetro de massas. Nessa etapa a fase móvel consistiu de uma mistura isocrática de acetonitrila:água:ácido fórmico (50:50:0,1 v/v/v) mantendo o fluxo em 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Não houve uso de coluna cromatográfica e os parâmetros foram ajustados automaticamente via software Analyst versão 1.4.

Para o desenvolvimento do método foram testadas diferentes colunas de fase reversa do tipo C8 e colunas de sílica pura. Devido as distintas polaridades entre a metformina e a vildagliptina uma coluna HILIC Atlantis de Silica (150 x 2,1 mm, 3  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula) foi utilizada no desenvolvimento do método. Para compor a fase móvel, diversas combinações de água, metanol e acetonitrila foram testadas, mantendo como aditivo 0,1% de ácido fórmico em todas as condições. O fluxo (200 a 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) e a temperatura de forno da coluna (25 – 50  $^{\circ}\text{C}$ ) também variaram de modo a obter o melhor perfil cromatográfico com o menor tempo de corrida.

Considerando as condições testadas, o uso de acetonitrila favoreceu a ionização dos compostos quando comparada ao metanol. Em outras palavras, houve melhora significativa na intensidade do sinal quando acetonitrila foi utilizada na fase móvel. Por consequência a sensibilidade foi favorecida.

Variações significativas de pressão também foram observadas no cromatógrafo quando metanol foi utilizado como agente diluente da amostra. A pressão do sistema também aumentou consideravelmente quando metanol foi utilizado na fase móvel. Portanto, a acetonitrila foi a primeira escolha como solvente orgânico para compor a fase móvel.

Para o desenvolvimento da cromatografia, diversas proporções de acetonitrila e água foram testadas (90:10 v/v a 50:50 v/v). No entanto, sob todas as condições houve alargamento do pico da vildagliptina, o qual também apresentou assimetria. Com o objetivo de resolver os problemas cromatográficos, algumas modificações na composição da fase móvel foram necessárias, incluindo a adição de formiato de amônio em diferentes concentrações (0,5 a 5 mM). Como resultado, o perfil cromatográfico da vildagliptina melhorou significativamente utilizando concentrações de formiato de amônio entre 2 e 3 mM e não foram visualizados problemas inerentes a assimetria do pico quando formiato de amônio foi utilizado na composição da fase móvel.

---

Ao término do desenvolvimento do método, o melhor perfil cromatográfico foi obtido mantendo a coluna a 40 °C e utilizando fase móvel com modo de eluição isocrático consistida de 20% de água (A) e 80% de solução acetoneitrila/água 95:5 v/v (B), ambos contendo 0,1 % de ácido fórmico e 3 mM de formiato de amônio. O melhor tempo de corrida foi alcançado mantendo o fluxo da fase móvel em 400 µL/min.

O novo método HILIC-EM/EM apresentou diversas vantagens quando comparado a outros métodos descritos na literatura. Por exemplo, quando comparado aos métodos por CG (BROHON; NOEL, 1978; LENNARD *et al.*, 1978) não houve necessidade de etapas de derivatização antes das injeções, fato que contribui para a redução do tempo no preparo de amostras e custo das análises. Em termos de rapidez, este método apresenta um dos menores tempos de corrida (3,5 min) para determinação das substâncias de interesse no plasma. Métodos com tempo de corrida pouco menor foram descritos, porém estes monitoram apenas a metformina isoladamente (KOSEKI *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2007) ou utilizam fluxos muito altos (> 1mL/min) (BONDE *et al.*, 2013; POLAGANIA *et al.*, 2013), o que aumenta a produção de lixo ambiental e o custo das análises.

Recentemente um método rápido para o monitoramento da metformina em plasma foi alcançado através dessorção térmica por laser de diodo/ ionização química a pressão atmosférica, uma técnica de introdução direta da amostra onde os analitos são dessorvidos simultaneamente dentro do espectrômetro de massas sem o uso de colunas cromatográficas (SWALES; GALLAGHER; PETER, 2010). No entanto, esse sistema resultou em variações significativas de precisão e exatidão, possivelmente devido à supressão iônica e/ou efeito matriz.

O interesse em métodos HILIC-EM/EM tem aumentado nos últimos anos, tendo em vista que nesse sistema uma quantidade maior de solvente orgânico é utilizada para compor a fase móvel, o que favorece a ionização dos compostos e aumenta consideravelmente a sensibilidade no detector de massas (YANG; BOYSEN; HEARN, 2009). Nesse contexto, o método desenvolvido apresentou limites de detecção (ítem 4.3.1) aproximadamente 2 (LIU *et al.*, 2009), 3 (AMINI; AHMADIANI; GAZERANI, 2005), 5 (TACHE *et al.*, 2001), 10 (YUEN; PEH, 1998; ZARGHI *et al.*, 2003), 20 (RASHID *et al.*, 2014) e 40 (CHHETRI; THAPAA;

---

SCHEPDAELB, 2013) vezes menor que os obtidos com CLAE-UV e pelo menos 75 vezes menor que os obtido com eletroforese capilar (SONG *et al.*, 1998).

Para metformina o novo método também apresentou limites de detecção e quantificação similares ou menores que os limites obtidos com outros métodos por CLAE-EM (GEORGITA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; LIU; COLEMAN, 2009; GEORGITÃ *et al.*, 2010; SWALES; GALLAGHER; PETER, 2010; CHEN *et al.*, 2011; BONDE *et al.*, 2013; POLAGANIA *et al.*, 2013). Para a vildagliptina, os métodos descritos foram desenvolvidos apenas para fins qualitativos (HESS; MUSSHOFF; MADEA, 2011) ou apresentaram limites de detecção e quantificação 2 mil vezes maior que os limites obtidos com o novo método (item 4.3.1).

O novo método HILIC-EM/EM é também o único desenvolvido para a determinação simultânea da metformina e vildagliptina em plasma humano e também foi totalmente validado de acordo com os guias modernos de validação. Um tempo curto de corrida também foi alcançado em virtude da seletividade do EM e ao uso de fase móvel isocrática. A faixa linear de detecção foi alcançada com precisão e exatidão, e não houve produção significativa de resíduos graças ao baixo fluxo da fase móvel. Os cromatogramas representativos dos analitos e PIs são apresentados na Figura 03.

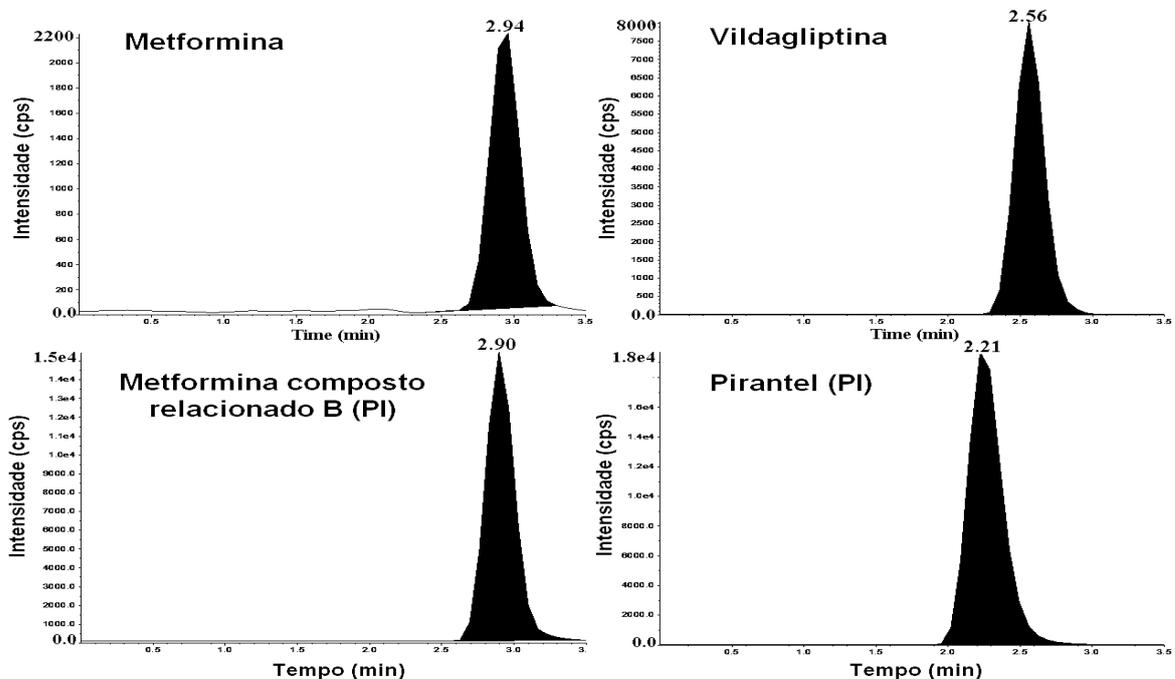


FIGURA 03: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) DE UMA AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADA COM METFORMINA, VILDAGLIPTINA, METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B E PIRANTEL. Dados: PI: padrão interno.

#### 4.2 TESTES DE EXTRAÇÃO / PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA

Ao término do desenvolvimento do método, diversos procedimentos de extração foram conduzidos de modo a obter a melhor recuperação dos analitos e PIs. Os testes incluíram extração em fase sólida utilizando cartucho OASIS HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) e precipitação de proteínas com acetonitrila ou metanol (contendo ou não 0,1% de ácido fórmico). A extração líquido-líquido não foi testada porque solventes orgânicos são incompatíveis com substâncias de alta polaridade, caso da metformina, podendo ser esperada uma baixa partição da metformina no solvente orgânico, sendo necessária várias etapas de extração para alcançar uma boa recuperação. O grande problema é que aumentando o número de etapas de extração também aumenta a possibilidade de erro operacional (pipetagem, agitação, eficiência da extração, etc), fato que prejudica a reprodutibilidade da extração.

Como resultado dos testes, a extração em fase sólida não foi eficiente para extrair os analitos já que o cartucho HLB reteve apenas a vildagliptina (substância menos polar). Dessa forma dois sorbentes seriam necessários para obter uma adequada recuperação dos analitos, um polar para extrair a metformina e outro não polar para extrair a vildagliptina. Do ponto de vista de recuperação isso seria interessante, porém o custo da análise seria excessivo e a etapa de pré-tratamento da amostra seria laboriosa.

A precipitação de proteínas (PPT) foi a única técnica que promoveu adequada recuperação da metformina, vildagliptina e PIs. No entanto, as proteínas não foram completamente precipitadas quando metanol (contendo ou não 0,1% de ácido fórmico) foi utilizado como agente precipitante. Além disso, as amostras com metanol promoveram variações na pressão do sistema, provavelmente pela interação das proteínas remanescentes e fosfolípidios com a coluna hidrofílica.

O uso de acetonitrila e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico promoveu uma rápida precipitação das proteínas formando um precipitado denso que foi facilmente removido por centrifugação. Além disso, o uso de acetonitrila acidificada demonstrou maior eficiência de extração quando comparada com acetonitrila pura e não foram evidenciadas variações significativas na recuperação

---

(CV<5%). Portanto, a técnica de precipitação de proteínas com acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico foi a primeira escolha para o pré-tratamento da amostra.

### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

#### 4.3.1 Limites de detecção e limite inferior de quantificação

A alta sensibilidade do método desenvolvido foi demonstrada através dos baixos limites de detecção (sinal-ruído >3) estimados em 1,5 ng/mL para a metformina e 0,75 ng/mL para vildagliptina. O limite inferior de quantificação baseado na relação sinal-ruído >10 com desejável precisão entre replicas de amostras (CV <10%) foi estimado em 5,0 ng/mL para ambas metformina e vildagliptina.

#### 4.3.2 Seletividade

Os cromatogramas obtidos com plasma normal, hemolisado, lipêmico e plasma normal fortificado com analitos e PIs são apresentados nas Figura 03. Conforme demonstrado, sinais interferentes da matriz biológica apareceram próximos aos tempos de retenção de metformina e vildagliptina. No entanto, nenhum desses sinais apresentou área superior a 5% da resposta do analito na concentração LLOQ, ou seja, esses sinais encontram-se a nível de ruído. O método desenvolvido foi, portanto, considerado seletivo.

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

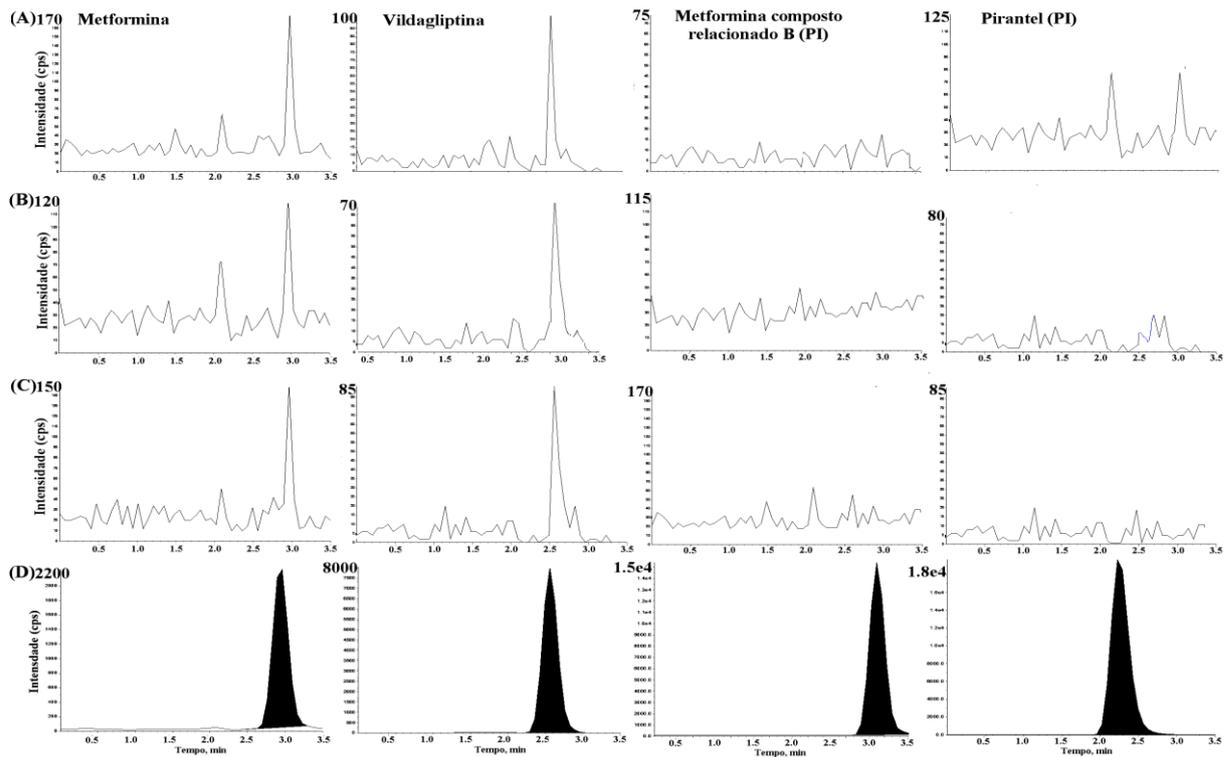


FIGURA 04: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) PARA O ESTUDO DA SELETIVIDADE. Dados: (a) plasma branco normal, (b) plasma branco lipêmico, (c) plasma branco hemolisado, (d) plasma branco normal fortificado com 5,0 ng/ml de metformina, 5,0 ng/ml de vildagliptina, 350 ng/ml de metformina composto relacionado B (PI) e 250 ng/mL de pirantel (PI).

### 4.3.3 Linearidade

Após três dias de avaliação, as curvas de calibração da metformina e da vildagliptina apresentaram excelente linearidade com coeficientes de correlação ( $r$ )  $>0.99$ . As médias da equação linear, os coeficientes de correlação e as curvas obtidas após a análise de regressão linear são apresentados nas Figuras 04 e 05. Para cada curva, em cada nível de concentração, as variações de precisão e exatidão foram menores que 10%, conforme apresentado nas Tabelas 03 e 04. Esses resultados indicam uma resposta confiável dentro dos limites de concentração estabelecidos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

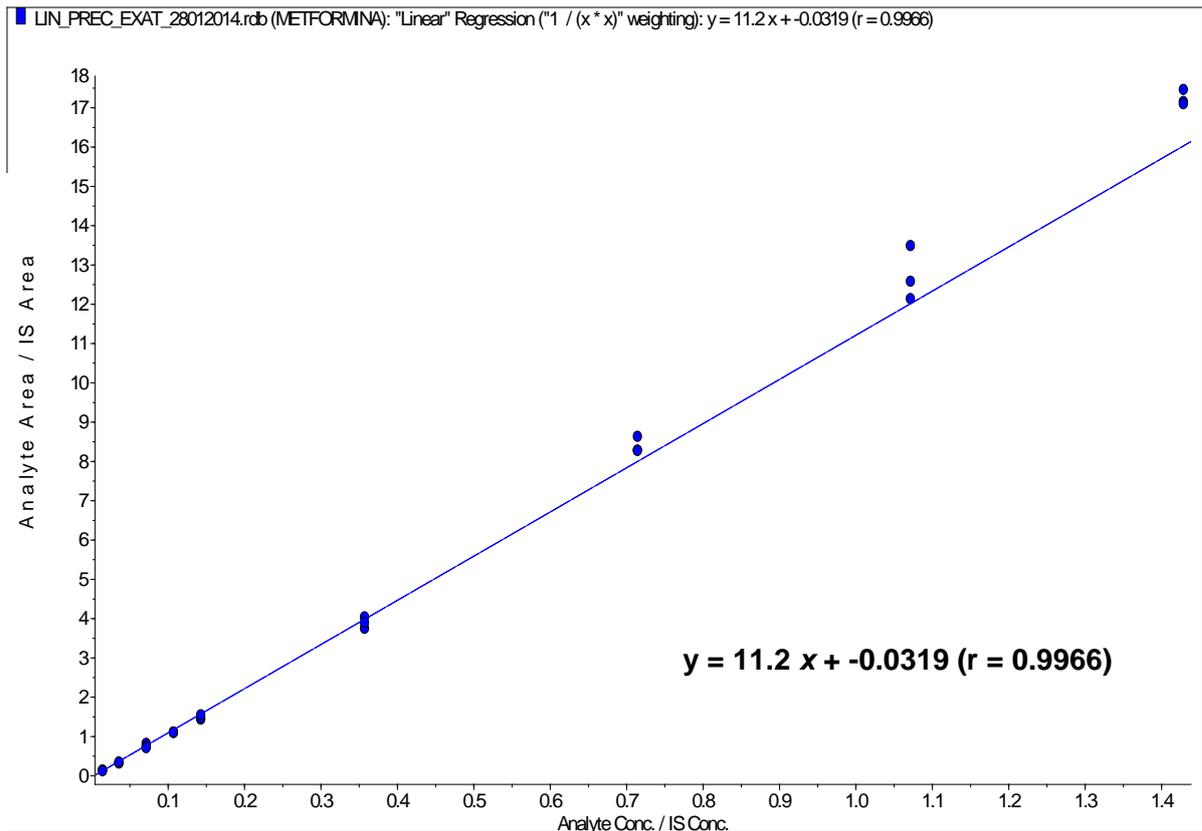


FIGURA 05: EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA METFORMINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR  $1/x^2$ . Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicata e em nove níveis de concentração. Os valores expressos da equação da reta e do coeficiente de correlação são referentes à média dos resultados obtidos através das injeções realizadas durante três dias consecutivos

TABELA 03 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA METFORMINA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Metformina	5,0	5,25	0,341	6,49	5,01
	12,5	11,36	0,482	4,24	-9,09
	25,0	24,68	1,752	7,10	-1,27
	37,5	35,40	0,181	0,51	-5,60
	50,0	47,29	1,768	3,74	-5,41
	125,0	122,30	4,559	3,73	-2,16
	250,0	262,45	6,381	2,43	4,98
	375,0	397,52	21,417	5,39	6,01
	500,0	537,65	6,102	1,13	7,53

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

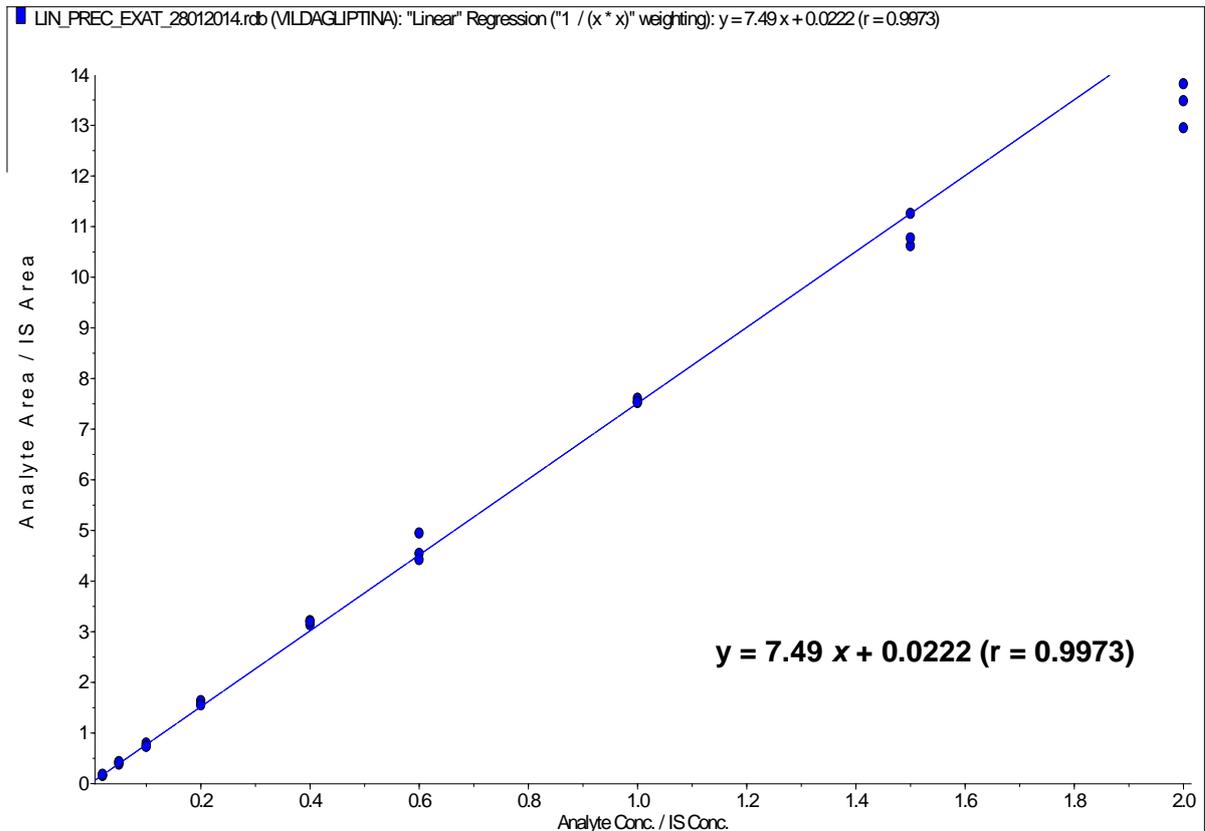


FIGURA 06: EQUAÇÃO DA RETA, COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E GRÁFICO DE LINEARIDADE DA VILDAGLIPTINA OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR  $1/x \cdot x$ . Dados: Gráfico obtido através de uma curva de calibração preparada em plasma, em triplicada, em nove níveis de concentração. Os valores expressos da equação da reta e do coeficiente de correlação são referentes à média dos resultados obtidos através das injeções realizadas durante cinco dias consecutivos

TABELA 04 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA VILDAGLIPTINA

Composto	Concentração nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Vildagliptina	5,0	4,90	0,395	8,06	2,07
	12,5	13,04	0,875	6,71	-4,32
	25,0	24,56	1,171	4,77	1,75
	37,5	43,96	1,427	2,73	-4,64
	50,0	52,32	1,400	1,33	-5,48
	125,0	154,04	9,178	5,96	-2,69
	250,0	251,50	1,517	0,60	-0,60
	375,0	362,53	11,124	3,07	3,32
	500,0	447,07	14,618	3,23	9,59

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo

4.3.4 Teste de efeito residual (*Carry over*)

Os cromatogramas obtidos com injeções alternadas de plasma branco e amostras de plasma preparadas no nível mais alto de concentração da curva de calibração são apresentados na Figura 06. Nenhum pico interferente foi observado no mesmo tempo de retenção dos analitos e dos padrões internos, não havendo, portanto, risco de contaminação causada pelo arraste dos analitos entre as injeções.

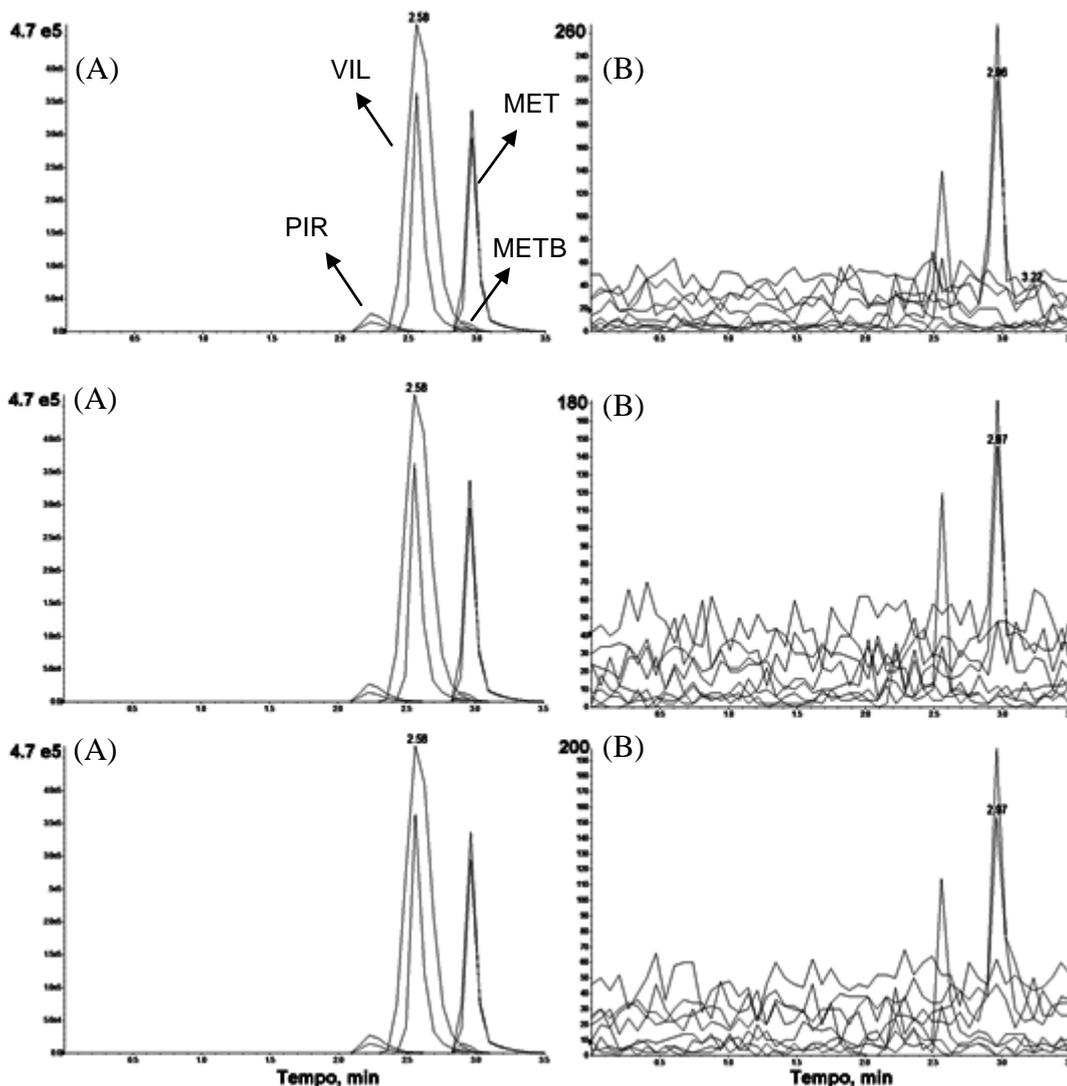


FIGURA 07: CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI+) ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE (A) AMOSTRAS CONTROLE PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO E (B) AMOSTRAS DE PLASMA BRANCO. Dados: MET: metformina, VIL: vildagliptina, PIR: pirantel (padrão interno) e METB: metformina composto relacionado B (padrão interno)

## 4.3.5 Precisão e exatidão

Conforme demonstrado na Tabela 05, para todos os compostos uma excelente precisão foi alcançada com valores de CV menores que 7,05% para análises intra-dia e menores que 9,01 para análises inter-dias. O novo método também apresentou exatidão satisfatória com valores de ER menores que 11,15% para análises intra e inter-dias. Os testes conduzidos com as amostras de controle de qualidade de diluição (CQD) demonstraram que o resultado obtido com as amostras diluídas são os mesmos daqueles obtidos com amostras não diluídas. Em virtude desses resultados, o novo método foi considerado preciso e exato.

TABELA 05. VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO HILIC-EM/EM

Compostos	Amostra controle	Exatidão			Precisão	
		Concentração padrão (ng/mL)	Intra-dia ER%	Inter-dia ER%	Intra-dia (CV%)	Inter-dia (CV%)
Metformina	CQ-LIQ	5,0	9,50	11,15	5,93	8,80
	CQB	12,5	-4,24	0,03	7,05	9,01
	CQM	100,0	-2,12	3,24	4,74	7,99
	CQA	375,0	7,88	4,74	2,37	8,85
	CQD	1000,0	-1,88	2,56	2,72	6,56
Vildagliptina	CQ-LIQ	5,0	-3,35	2,53	1,85	3,50
	CQB	12,5	6,77	10,06	3,42	3,73
	CQM	100,0	3,67	8,68	2,72	6,06
	CQA	375,0	5,60	-5,23	3,43	5,18
	CQD	1000,0	-2,32	5,57	3,31	6,32
METB*	-	350,0	5,31	3,39	2,89	7,45
Pirantel*	-	250,0	-7,45	-4,32	2,22	3,63

Dados: METB: metformina composto relacionado B; CQ-LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; CQD: controle de qualidade de diluição; ER%: erro relativo; CV%: coeficiente de variação; \*Padrão interno; \*\*Valor nominal após diluição de 10 vezes.

#### 4.3.6 Teste de recuperação

Os resultados de recuperação encontram-se sumarizados na Tabela 06. Para todos os compostos uma recuperação satisfatória (>75%) foi alcançada com alta reprodutibilidade (CV <4,0%). A técnica de precipitação de proteínas com acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) foi considerada efetiva para extrair do plasma metformina, vildagliptina, pirantel (PI) e metformina composto relacionado B (PI).

TABELA 06. RECUPERAÇÃO DA METFORMINA, VILDAGLIPTINA, PIRANTEL (PI) E METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B (PI) OBTIDAS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA (0,1% ÁCIDO FÓRMICO)

Compostos	Recuperação			
	Concentração adicionada (ng/mL)	Concentração recuperada (ng/mL ± DP%)	Média de recuperação (%)	Precisão da extração (CV%)
Metformina	12,5	11,63 ± 0,22	93,0	1,89
	375,0	334,50 ± 8,80	89,2	2,65
Vildagliptina	12,5	13,41 ± 0,20	107,3	1,49
	375,0	387,08 ± 11,53	103,2	2,98
Metformina composto relacionado B*	350,0	340,73 ± 6,50	97,3	1,91
Pirantel*	250,0	189,90 ± 7,29	76,0	3,83

DP: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação expresso em percentagem; \*padrão interno

#### 4.3.7 Efeito matriz

Os resultados do teste do efeito matriz encontram-se dispostos na Tabela 07. Como é possível visualizar, as variações (CV%) obtidas entre os fatores de matriz normalizados (FMNs) de cada composto foram inferiores a 15% (quinze por cento), indicando que o efeito da matriz biológica na resposta dos analitos e PIs é insignificante.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**TABELA 07 – VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DA METFORMINA E VILDAGLIPTINA CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ (n= 8)**

Compostos	Efeito matriz		
	FMN**	Média ± DP	FMN (CV%)
Metformina	0,0891(CQB) 0,0877(CQA)	0,0884 ± 0,0009	1,04
Vildagliptina	1,1799(CQB) 1,2414(CQA)	1,2107 ± 0,0435	3,59

DP: desvio padrão; CV%: coeficiente de variação expresso em percentagem; \*padrão interno; \*\*FMN: Fator de matriz normalizado calculado de acordo com a equação 04 para CQB e CQA dos dois analitos.

#### 4.3.8 Teste do aumento/supressão iônica

O grau de aumento ou de supressão iônica foi investigado para verificar uma possível interferência no sinal das substâncias causado pela co-eluição dos analitos e PIs. Conforme demonstrado na Tabela 08, o grau de aumento ou de supressão iônica foi inferior a 7,89%. Além disso, os valores de  $p > 0,05$  indicaram que a média das áreas dos picos dos analitos ou PIs injetadas separadamente são similares as áreas obtidas com as substâncias co-eluídas. Portanto, mesmo havendo co-eluição não houve efeito significativo que pudesse influenciar na quantificação das substâncias de interesse.

**TABELA 08 – CO-ELUIÇÃO DE PARES DOS ANALITOS E AS EXTENSÕES RELATIVAS DO AUMENTO OU SUPRESSÃO IÔNICA MEDIDAS COM O NOVO MÉTODO HILIC-EM/EM**

Co-eluição de pares dos analitos		Extensão relativa do aumento ou supressão iônica de	
Analito (A)	Padrão interno (B)	A influenciado por B (média% ± CV, valor de p *)	B influenciado por A (média% ± CV, valor de p *)
Metformina	Metformina composto relacionado B	-2,54 ± 4,53 (p=0,2880)	-7,89 ± 3,84 (p=0,1081)
Vildagliptina	Pirantel	3,23 ± 2,48 (p=0,2011)	-4,96 ± 2,22 (p=0,1556)

Dados: CV%: coeficiente de variação expresso em percentagem; \*teste t de Student pareado (95% de confiança)

#### 4.3.9 Teste de estabilidade

A Tabela 09 resume as diferenças entre os resultados obtidos com os analitos e os padrões internos armazenados sob diferentes condições, e os resultados obtidos com amostras preparadas a fresco. Sob as condições avaliadas, os erros de precisão (CV%) e exatidão (ER%) foram menores do que 15%, indicando que não houve diferenças significativas nas respostas dos analitos de interesse após o manuseio e armazenamento das amostras. Portanto, uma adequada estabilidade foi verificada.

---

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**TABELA 09. ESTABILIDADE DA METFORMINA, VILDAGLIPTINA, PIRANTEL E METFORMINA COMPOSTO RELACIONADO B (METB) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO (n = 8)**

Estabilidade		Metformina		Vildagliptina		METB*	Pirantel*
		Nível 12,5 (ng/mL)	Nível 375,0 (ng/mL)	Nível 12,5 (ng/mL)	Nível 375,0 (ng/mL)	Nível 350,0 (ng/mL)	Nível 250,0 (ng/mL)
6 h na bancada	Média recuperada (ng/mL ± dp)	12,4 ± 0,1	367,2 ± 5,4	12,4 ± 0,1	348,9 ± 17,7	345,9 ± 2,9	244,5 ± 3,8
	CV (%)	0,78	1,48	0,73	1,78	0,84	1,57
	ER (%)	-0,48	-2,07	-1,03	-2,48	-1,18	-2,19
15 dias a 4 °C	Média recuperada (ng/mL ± dp)	11,8 ± 0,5	345,2 ± 20,2	12,1 ± 0,2	348,9 ± 17,7	338,69 ± 12,3	230,5 ± 13,2
	CV (%)	3,86	5,85	2,09	5,09	2,32	5,74
	ER (%)	-5,31	-7,95	-2,91	-6,95	-3,23	-7,80
Curta duração	Média recuperada (ng/mL ± dp)	13,2 ± 0,2	341,5 ± 21,2	12,2 ± 0,3	355,1 ± 17,1	337,1 ± 11,4	260,7 ± 9,6
	CV (%)	1,52	6,21	2,62	4,82	3,38	3,68
	ER (%)	5,60	-8,93	-2,4	-5,3	-3,69	4,28
Ciclos de descongel.	Média recuperada (ng/mL ± dp)	12,8 ± 0,2	381,3 ± 4,5	12,7 ± 0,2	383,18 ± 5,8	NA	NA
	CV (%)	1,84	1,19	1,34	1,52	NA	NA
	ER (%)	2,64	1,69	1,91	2,18	NA	NA
Longa duração	Média recuperada (ng/mL ± dp)	11,9 ± 0,4	354,82 ± 16,8	12,1 ± 0,3	377,4 ± 10,3	NA	NA
	CV (%)	3,36	4,73	3,63	2,73	NA	NA
	ER (%)	-4,8	-5,38	-3,2	0,64	NA	NA
Pós- preparativa	Média recuperada (ng/mL ± dp)	11,0 ± 0,4	331,1 ± 6,7	11,3 ± 0,1	325,6 ± 0,3	307,2 ± 6,1	218,2 ± 5,1
	CV (%)	3,61	2,02	0,88	0,95	1,97	2,35
	ER (%)	-10,2	-11,71	-9,94	-6,98	-12,23	-12,72

Dados: NA: não aplicável; \*Padrão interno; CV: coeficiente de variação; ER: erro relativo

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO

O novo método HILIC-EM/EM desenvolvido e validado nesse estudo foi aplicado com sucesso na determinação da metformina e vildagliptina em amostras reais de plasma humano. Os resultados são apresentados na Tabela 10. Conforme demonstrado, nos três tempos de coleta foi possível quantificar a metformina e a vildagliptina em amostras de voluntários que receberam por via oral uma dose de Glifage® (cloridrato de metformina 850 mg), Galvus® (vildagliptina 50 mg) e Galvus Met® (vildagliptina 50 mg + cloridrato de metformina 850 mg). Os resultados demonstraram a presença de diferentes níveis dessas substâncias no plasma dos voluntários, mostrando a variabilidade individual. Esses resultados indicam que o novo método é adequado para a determinação da metformina e vildagliptina em plasma humano e pode ser utilizado como uma ferramenta analítica para o monitoramento clínico dessas substâncias em pacientes com diabetes.

TABELA 10. QUANTIDADE DE METFORMINA E VILDAGLIPTINA DETERMINADA NO PLASMA DE VOLUNTÁRIOS QUE RECEBERAM MEDICAMENTOS CONTENDO OS FÁRMACOS SEPARADOS OU EM TERAPIA COMBINADA

Tempo de coleta (horas)	Medicamentos			
	Glifage®	Galvus®	Galvus Met®	
	Metformina ng/mL ± DP	Vildagliptina ng/mL ± DP	Metformina ng/mL ± DP	Vildagliptina ng/mL ± DP
1	110,0 ± 12,21	6,78 ± 1,48	114,0 ± 9,90	11,1 ± 2,69
2	122,3 ± 11,02	23,2 ± 5,38	220,0 ± 57,07	22,9 ± 4,95
3	108,3 ± 7,51	32,8 ± 8,96	265,5 ± 41,71	22,7 ± 5,44

Dados: n=6; DP: desvio padrão; Formulação comercial disponível: Glifage® (cloridrato de metformina 850 mg), Galvus® (vildagliptina 50 mg) e Galvus Met® (vildagliptina 50 mg + cloridrato de metformina 850 mg)

---

---

## **5. CONCLUSÃO**

---

---

## CONCLUSÃO

---

O método HILIC-EM/EM desenvolvido nesse estudo apresentou-se adequado para a determinação da metformina e vildagliptina no plasma humano. Dados do estudo de validação demonstraram que o método é seletivo, linear, preciso, exato e livre de efeitos residual e de matriz. Sob condições normais de trabalho uma excelente estabilidade foi verificada para todos os compostos, tanto em matriz quanto em solução. O novo método foi aplicado com sucesso em amostras reais de plasma de voluntários que receberam via oral comprimidos contendo metformina, vildagliptina ou terapia combinada desses fármacos. O resultado mostrou a variabilidade individual no nível plasmático dessas substâncias. Esses resultados sugerem que o novo método pode ser utilizado como uma ferramenta no auxílio do tratamento de pacientes com diabetes que utilizam metformina e vildagliptina, uma vez que através do monitoramento plasmático dessas substâncias é possível avaliar a adesão ao tratamento e realizar o ajuste de dose para garantir a efetividade do tratamento.

---

---

---

## **6. REFERÊNCIAS**

---

---

---

ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p.S62-69, 2011.

Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, n.3, p.177-196, 1990.

Amini, H.; Ahmadiani, A.;Gazerani, P. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography B**, v. 824, n. 1-2, p.319-22, 2005.

Barcelo, A.; Aedo, C.; Rajpathak, S.; Robles, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 1, p.19-27, 2003.

Bhavesh, D.; Chetan, G.; Bhat, K. M.; Shivprakash. Estimation and pharmacokinetics of metformin in human volunteers. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 41, n. 2, p.135-139, 2007.

Blahová, E.;Brandsteterová, E. Approaches in sample handling before HPLC analysis of complex matrices. **Chemical Papers**, v. 58, n. 5, p.362-373, 2004.

Blonde, L. Current antihyperglycemic treatment guidelines and algorithms for patients with type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Medicine**, v. 123, n. 1, p.S12-S18, 2010.

Bolli, G.; Dotta, F.; Rochotte, E.; Cohen, S. E. Efficacy and tolerability of vildagliptin vs. pioglitazone when added to metformin: a 24-week, randomized, double-blind study. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 10, n. 1, p.82-90, 2008.

Bonde, S. L.; Bhadane, R. P.; Gaikwad, A.; Katale, D.; Gavali, S.; Narendiran, A. S. A simple and sensitive method for determination of metformin and sitagliptin in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5, p.463-470, 2013.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA). Resolução 899 de 29 maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 2003.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA). Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos. Brasília-DF, 2012.

Brohon, J.;Noel, M. Determination of metformin in plasma at therapeutic levels by gas-liquid-chromatography using a nitrogen detector. **Journal of Chromatography**, v. 146, n. 1, p.148-151, 1978.

Campbell, I. W.;Howlett, H. C. S. Worldwide experience of metformin as an effective glucose-lowering agent - a metaanalysis. **Diabetes-Metabolism Reviews**, v. 11, p.S57-S62, 1995.

---

---

Campbell, R. K. Type 2 diabetes: Where we are today: An overview of disease burden, current treatments, and treatment strategies. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 49, p.S3-S9, 2009.

Cass, Q. B.; Degani, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégia e Validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

Cefalu, W. T. Clinical management strategies for type 2 diabetes. **JAAPA**, Suppl: 9-14, 2007.

Chen, L. Y.; Zhou, Z. F.; Shen, M.; Ma, A. D. Simultaneous determination and pharmacokinetic study of metformin and rosiglitazone in human plasma by HPLC-ESI-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 2, p.94-100, 2011.

Chen, X. Y.; Gu, Q.; Qiu, F.; Zhong, D. F. Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Journal of Chromatography B**, v. 802, n. 2, p.377-381, 2004.

Cheng, C. L.;Chou, C. H. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 762, n. 1, p.51-58, 2001.

Chhetri, H. P.; Thapaa, P.;Schepdaelb, A. V. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. **Saudi Pharmaceutical Journal**, *In press*, 2013.

Ciola, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

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.2387-2409, 2008.

FDA. **Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. U. S. Department of Health and Human Service. Food and Drug Administration 2013.

Ferrannini, E.; Fonseca, V.; Zinman, B.; Matthews, D.; Ahren, B.; Byiers, S.; Shao, Q.; Dejager, S. Fifty-two-week efficacy and safety of vildagliptin vs. glimepiride in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin monotherapy. **Diabetes Obesity & Metabolism**, v. 11, n. 2, p.157-166, 2009.

Flanagan, R. J.; Morgan, P. E.;Spencer, E. P. Micro-extraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 6-7, p.530-538, 2006.

Gabr, R. Q.; Padwal, R. S.;Brocks, D. R. Determination of metformin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using small sample volume and conventional octadecyl silane column. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 4, p.486-494, 2010.

---

---

Georgita, C.; Albu, F.; David, V.; Medvedovici, A. Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS. **Journal of Chromatography B**, v. 854, n. 1-2, p.211-218, 2007.

Georgitã, C.; Sora, I.; Albu, F.; Monciu, C. M. Comparison of a LC/MS method with a LC/UV method for the determination of metformin in plasma samples. **Farmacia** v. 58, n., p.158-169, 2010.

Goke, B. Islet cell function: alpha and beta cells - partners towards normoglycaemia. **International Journal of Clinical Practice**, v. 62, n.1, p.2-7, 2008.

Gopi, G.; Manikandan, M.; Roja, D. N.; Thirumurugu, S.; Kannan, K.; Arumainayagam, D. C.; Manavalan, R. Pharmacokinetic evaluation of metformin hydrochloride with stevias in human volunteers. **Journal of Pharmaceutical Sciences & Research**, v. 4, n. 1, p.1676, 2012.

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. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 1, p.33-41, 2011.

Huttunen, K. M.; Rautio, J.; Leppanen, J.; Vepsalainen, J.; Keski-Rahkonen, P. Determination of metformin and its prodrugs in human and rat blood by hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p.469-474, 2009.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). **Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, v., n., 2005.

INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008. **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial**, v., n., 2003.

IUPAC. Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p.649-666, 1995.

Kataoka, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p.232-244, 2003.

Korfmacher, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 20, p.1357-1367, 2005.

Koseki, N.; Kawashita, H.; Niina, M.; Nagae, Y.; Masuda, N. Development and validation for high selective quantitative determination of metformin in human plasma by cation exchanging with normal-phase LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p.1063-1072, 2005.

---

---

Lennard, M. S.; Casey, C.; Tucker, G. T.; Woods, H. F. Determination of Metformin in Biological Samples. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 6, n. 2, p.183-185, 1978.

Li, N.; Deng, Y.; Qin, F.; Yu, J.; Li, F. M. Simultaneous quantification of metformin and glipizide in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 27, n. 2, p.191-196, 2013.

Liu, A.; Coleman, S. P. Determination of metformin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 29, p.3695-3700, 2009.

Liu, Q. F.; Li, Z. D.; Shi, X. J.; Jiao, Z.; Zhong, M. K. Simple and sensitive determination of metformin in human plasma using an ion-pair LC method. **Chromatographia**, v. 70, n. 9-10, p.1511-1514, 2009.

Ma, J.; Shi, J.; Le, H.; Cho, R.; Huang, J. C.; Miao, S.; Wong, B. K. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1, n. 2, p.219-226, 2008.

Marques, M. a. S.; Soares, A. D.; Pinto, O. W.; Barroso, P. T. W.; Pinto, D. P.; Ferreira, M.; Werneck-Barroso, E. Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1-2, p.308-316, 2007.

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

Matthews, D. R.; Dejager, S.; Ahren, B.; Fonseca, V.; Ferrannini, E.; Couturier, A.; Foley, J. E.; Zinman, B. 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 Obesity & Metabolism**, v. 12, n. 9, p.780-789, 2010.

Nathan, D.; Buse, J. B.; Davidson, M. B.; Ferrannini, E.; Holman, R. R.; Sherwin, R.; Zinman, B. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 1, p.17-30, 2009.

NCBI. **PubChem Compound. Disponível em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 01/08/2014** 2014.

Nováková, L.; Vlcková, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1, p.8-35, 2009.

---

---

Patel, D. Matriz effect in a view of LC-MS/MS: An overview. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 1, p.559-564, 2011.

Pharne, A. B.; Santhakumari, B.; Ghemud, A. S.; Jain, H. K.; Kulkarni, M. J. Bioanalytical method development and validation of vildagliptin a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor by RP-HPLC method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 4, n., p.119-123, 2012.

Polagania, S. R.; Pillib, N. R.; Gajulab, R.; Gandu, V. Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n., p.9-19, 2013.

Polson, C.; Sarkar, P.; Incledon, B.; Raguvaran, V.; Grant, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 2, p.263-275, 2003.

Porta, V.; Schramm, S. G.; Kano, E. K.; Koono, E. E.; Armando, Y. P.; Fukuda, K.; Serra, C. H. R. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 1, p.143-147, 2008.

Ranetti, M. C.; Ionescu, M.; Hinescu, L.; Ionica, E.; Anuta, V.; Ranetti, A. E.; Stecoza, C. E.; Mircioiu, C. Validation of a HPLC method for the simultaneous analysis of metformin and gliclazide in human plasma. **Farmacia**, v. 57, n. 6, p.728-735, 2009.

Rashid, A.; Ahmad, M.; Minhas, M. U.; Hassan, I. J.; Malik, M. Z. Pharmacokinetic studies of metformin and glibenclamide in normal human volunteers. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 27, p.153-159, 2014.

Remane, D.; Meyer, M. R.; Wissenbach, D. K.; Maurer, H. H. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 21, p.3103-3108, 2010.

Rhodes, C. J.; White, M. F. Molecular insights into insulin action and secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n.1, p.3-13, 2002.

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

Shah, V. P. The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation. **The APPS Journal**, v. 9, n. 1, p.43-47, 2007.

Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p.171-176, 2000.

---

---

Siddiquia, F. A.; Sherb, N.; Shafia, N.; Bahadurb, S. S. Simultaneous determination of metformin, captopril, lisinopril, and enalapril: its application to pharmacokinetics. **Arabian Journal of Chemistry**, v., n., 2013.

Song, J. Z.; Chen, H. F.; Tian, S. J.; Sun, Z. P. Determination of metformin in plasma by capillary electrophoresis using field-amplified sample stacking technique. **Journal of Chromatography B**, v. 708, n. 1-2, p.277-283, 1998.

Stumvoll, M.; Goldstein, B. J.; Van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, n. 9467, p.1333-1346, 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. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p.740-744, 2010.

Tache, F.; David, V.; Farca, A.; Medvedovici, A. HPLC-DAD determination of Metformin in human plasma using derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system. **Microchemical Journal**, v. 68, n. 1, p.13-19, 2001.

Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardins, I. C. S. F.; Collins, C. H. Fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p.616-623, 2002.

USP. **The United States Pharmacopeia. USP 30 - NF 25**. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

Wal, P.; Kumar, B.; Bhandari, A.; Rai, A. K.; Wal, A. Bioanalytical method development-determination of drugs in biological fluids. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 10, p.333-347, 2010.

Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p.1047-53, 2004.

Yang, Y. Z.; Boysen, R. I.; Hearn, M. T. W. Hydrophilic interaction chromatography coupled to electrospray mass spectrometry for the separation of peptides and protein digests. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 29, p.5518-5524, 2009.

Yardimci, C.; Ozaltin, N.; Gurlek, A. Simultaneous determination of rosiglitazone and metformin in plasma by gradient liquid chromatography with UV detection. **Talanta**, v. 72, n. 4, p.1416-1422, 2007.

Yuen, K. H.; Peh, K. K. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of metformin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 710, n. 1-2, p.243-246, 1998.

---

---

Zarghi, A.; Foroutan, S. M.; Shafaati, A.; Khoddam, A. Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 1, p.197-200, 2003.

Zhang, L.; Tian, Y.; Zhang, Z. J.; Chen, Y. Simultaneous determination of metformin and rosiglitazone in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 854, n. 1-2, p.91-98, 2007.

---

---

---

## ***7. ANEXO 1***

---

---

---

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você, homem ou mulher, está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “Desenvolvimento de um método bioanalítico para a determinação de metformina e vildagliptina em plasma humano”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
  - b) O objetivo desta pesquisa é desenvolver um método de análise para dosear no plasma a metformina e a vildagliptina. A partir de então poderemos monitorar a quantidade dessas substâncias no organismo, e então propor o ajuste de dose para garantir a efetividade e a segurança clínica do tratamento.
  - c) Caso você participe da pesquisa, será necessário comparecer ao CEB/UFPR, localizado na Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba/PR, para uma entrevista.
  - d) Durante o estudo você poderá experimentar algum desconforto, principalmente relacionado à punção proveniente da coleta de sangue.
  - e) É pouco provável a intercorrência de riscos no estudo mesmo porque não haverá modificações quanto ao uso de seus medicamentos usuais os quais são amplamente usados por diabéticos tipo 2. Para todas as coletas de sangue serão utilizados materiais estéreis e descartáveis.
  - f) Se for selecionado para o estudo, você deverá comparecer ao Laboratório Escola da UFPR localizado na Av. General Carneiro, 181, Curitiba/PR, em data, local e hora determinados, onde será realizada a coleta de sangue. Após o almoço, você fará uso de seu medicamento normalmente e então será realizada coleta de 3 mL de sangue após 1, 2 e 3 horas da administração do seu remédio
  - g) Embora não exista nenhum benefício direto pela sua participação, o mesmo trará benefícios a população que usa esse medicamento, pois a partir desse estudo será possível ajustar a dose e garantir a efetividade e a segurança do produto.
  - h) O pesquisador Roberto Pontarolo, farmacêutico, professor e coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR é o responsável pela pesquisa, e poderá esclarecer eventuais dúvidas a respeito de sua participação. A qualquer momento você poderá entrar em contato com o Prof. Roberto pelo email [pontarolo@ufpr.br](mailto:pontarolo@ufpr.br), ou pelo telefone 41-33604094.
  - i) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.
-

---

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

## CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter sido devidamente esclarecido sobre a justificativa, objetivos da pesquisa e os procedimentos a que serei submetido, e receber a garantia de ser esclarecido sobre qualquer dúvida e de ter a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, consinto, de livre e espontânea vontade, em participar da pesquisa "Desenvolvimento de um método bioanalítico para a determinação de metformina e vildagliptina em plasma humano".

---

Voluntário

---

Testemunha

---