

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISA DE FREITAS MONTIN

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE SITAGLIPTINA EM PLASMA HUMANO

CURITIBA

2020

ELISA DE FREITAS MONTIN

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE-EM/EM PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE SITAGLIPTINA EM PLASMA HUMANO

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área Medicamentos, Insumos e Correlatos, Linha de Pesquisa Produção e Qualidade, Departamento de Farmácia do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Seiji Murakami  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Martins  
Guimarães

CURITIBA

2020

Montin, Elisa de Freitas

Desenvolvimento e validação de método por CLAE-EM/EM para quantificação de sitagliptina em plasma humano [recurso eletrônico] / Elisa de Freitas Montin – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Professor Dr. Fábio Seigi Murakami

Coorientadora: Professora Dra. Thais Martins Guimarães

1. Sitagliptina. 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).  
3. Espectrometria de Massas Sequencial (EM/EM). 4. Validação bioanalítica.  
5. Farmacocinética. I. Murakami, Fábio Seigi. II. Guimarães, Thais Martins.  
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.7

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ELISA DE FREITAS MONTIN** intitulada: **Desenvolvimento e Validação de Método por CLAE-EM/EM para Quantificação de Sitagliptina em Plasma Humano**, sob orientação do Prof. Dr. FÁBIO SEIGI MURAKAMI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Março de 2020.



FÁBIO SEIGI MURAKAMI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE JOINVILLE)



TATIANA ZUCCOLOTTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Aos meus pais, Elias e Mirian, por serem meus primeiros mestres, por todo amor e carinho.

Ao Anderson, pela parceria, alegria, cuidado e amor.

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para que esse trabalho fosse realizado e concluído, mas as palavras não são capazes de expressar minha gratidão a elas.

À Deus por me conceder a vida, me iluminar e guardar ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Elias Montin e Mirian Montin, por sempre estarem ao meu lado, apoiando, inspirando e incentivando a sempre fazer o melhor.

Ao Anderson Latenik, por todo amor, carinho e paciência nos momentos mais difíceis. Por me fazer ver que os problemas são menores do que parecem e que para resolve-los é necessário paciência e perseverança.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami, pela oportunidade de aprender tanto, por sempre apoiar, incentivar e inovar. Obrigada por me permitir realizar um trabalho fora do comum.

Agradeço a minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Martins Guimarães por toda paciência, dedicação e amizade.

A todo o grupo de pesquisa QUALITEC (Aline, Andressa, Claudia, Gracinha, Mariana, Nayana, Susana e Raul), por confiarem em mim, companheirismo, parceria e risadas diárias.

A todo o grupo de pesquisa do Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB), principalmente ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo que permitiu a utilização de toda a infraestrutura do CEB para a realização dos experimentos. Agradeço em especial a Mariana Fachi, por todo o acompanhamento, ensinamento, conselhos e ajuda no desenvolvimento e aplicação desse estudo.

A Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, permitindo a realização desse mestrado.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta ajudaram na realização desse trabalho: muito obrigada!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

## RESUMO

A terapia medicamentosa deve ser considerada para pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) que não alcançam o controle glicêmico mesmo após a alteração no estilo de vida. Dentre as opções disponíveis destaca-se o fosfato monohidratado de sitagliptina (STG). A adesão terapêutica do paciente é fundamental para sua qualidade de vida. Uma das alternativas para aumentar a adesão ao tratamento, é adaptar as formulações existentes. O desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica contendo STG pode alterar suas características farmacocinéticas, fazendo-se necessário o estudo comparativo entre as formulações. Para este fim, é necessário que a metodologia bioanalítica seja capaz de quantificar o STG em intervalos de concentração plasmática adequadas. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver, validar e aplicar um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE - EM/EM) para a quantificação do STG em plasma humano. As análises foram realizadas utilizando o sistema CLAE Agilent 1200, acoplado ao espectrômetro de massas Triplo Quadrupolo Applied Biosystems API 3200, com fonte de ionização *electrospray*, operando no modo positivo de ionização. Após o desenvolvimento, o método foi validado de acordo com as normativas nacional e internacional vigentes. O método foi realizado em coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu$ m) acoplada a uma pré-coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m), mantidas a 35 °C. A fase móvel consistiu em água e acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, com eluição gradiente. O fluxo foi mantido em 0,3 mL/min. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L. O método desenvolvido mostrou-se seletivo, livre de efeito residual e de matriz. O baixo limite de quantificação indicou que o método é sensível (LIQ = 1,5 ng/mL). As curvas de calibração apresentaram uma correlação ( $r \geq 0,99$ ) nas faixas de 1,5 a 500 ng/mL para a sitagliptina. O método foi preciso (CV < 13,1%) e exato (EPR < 11,8%). A recuperação da sitagliptina e do padrão interno (fluconazol) > 90%. A estabilidade dos analitos foi observada tanto em plasma quanto em solução. A aplicabilidade do método foi demonstrada por meio de um estudo farmacocinético parcial, entre duas formulações contendo sitagliptina, sendo adequado ao objetivo proposto.

**Palavras-chave:** Sitagliptina; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE); Espectrometria de Massas Sequencial (EM/EM); Validação Bioanalítica; Farmacocinética.



## ABSTRACT

Drug therapy should be considered for patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) who do not achieve glycemic control even after changes in lifestyle. Among the options available, sitagliptin phosphate monohydrate (STG) stands out. The patient's therapeutic adherence is fundamental to his quality of life. One of the alternatives to increase adherence to treatment is to adapt existing formulations. The development of a new pharmaceutical form containing STG can alter its pharmacokinetic characteristics, making a comparative study between formulations necessary. For this purpose, it is necessary that the bioanalytical methodology is able to quantify the STG in appropriate plasma concentration ranges. Thus, the present study aimed to develop, validate and apply a high performance liquid chromatography method coupled to mass spectrometry (HPLC-EM/EM) for the quantification of STG in human plasma. The analyzes were performed using the CLAE Agilent 1200 system, coupled to the Applied Biosystems API 3200 Triple Quadrupole mass spectrometer, with electrospray ionization source, operating in the positive ionization mode. After development, the method was validated according to the national and international regulations in force. The method was performed on a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 x 50 mm, 3.5  $\mu$ m) coupled to a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 x 12.5 mm, 5  $\mu$ m), maintained at 35 °C. The mobile phase consisted of water and acetonitrile, both containing 0.1% formic acid, with gradient elution. The flow was maintained at 0.3 ml/min. The injection volume was 20  $\mu$ L. The method developed was selective, free of residual and matrix effects. The low limit of quantification indicated that the method is sensitive (LLQ = 1.5 ng/mL). The calibration curves showed a correlation ( $r \geq 0.99$ ) in the 1.5 to 500 ng / mL ranges for sitagliptin. The method was precise (CV < 13.1%) and accurate (SE < 11.8%). Recovery of sitagliptin and internal pattern (fluconazole) > 90%. Analyte stability was observed in both plasma and solution. The applicability of the method was demonstrated by means of a partial pharmacokinetic study, between two formulations containing sitagliptin, being adequate to the proposed objective.

**Keywords:** Sitagliptin; High Performance Liquid Chromatography (HPLC); Sequential Mass Spectrometry (EM / EM); Bioanalytical Validation; Pharmacokinetics.

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO .....	48
EQUAÇÃO 2 - ERRO PADRÃO RELATIVO .....	48
EQUAÇÃO 3 - FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO .....	49

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESTRUTURA MOLECULAR DO FOSFATO MONOIDRATADO DE SITAGLIPTINA.....	26
FIGURA 2 –	MECANISMO DE AÇÃO DA SITAGLIPTINA.....	27
FIGURA 3 –	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA SITAGLIPTINA E DO FLUCONAZOL.....	37
FIGURA 4 –	ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO PARA OS PADRÕES ANALÍTICOS SITAGLIPTINA E FLUCONAZOL.....	54
FIGURA 5 –	CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADO COM 125 ng/mL DE SITAGLIPTINA E 100 ng/mL DE PADRÃO INTERNO.....	56
FIGURA 6 –	RECUPERAÇÃO DA SITAGLIPTINA EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES.....	57
FIGURA 7 –	SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA NORMAL, HEMOLISADO, LIPÊMICO E LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO DA SITAGLIPTINA.....	59
FIGURA 8 –	SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA NORMAL, HEMOLISADO, LIPÊMICO E PADRÃO INTERNO.....	60
FIGURA 9 –	CROMATOGRAMA DA TRANSIÇÃO 235 DA SITAGLIPTINA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA BRANCO FORTIFICADO NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 0,5 ng/mL.....	61
FIGURA 10 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA OBTIDA PELA TRIPLICATA DE CADA CONCENTRAÇÃO NO 1º DIA.....	63
FIGURA 11 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA OBTIDA PELA TRIPLICATA DE CADA CONCENTRAÇÃO NO 2º DIA.....	64
FIGURA 12 –	CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA OBTIDA PELA TRIPLICATA DE CADA CONCENTRAÇÃO NO 3º DIA.....	64
FIGURA 13 –	CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DA SITAGLIPTINA.....	68

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DO FLUCONAZOL.....	69
FIGURA 15 – PERFIL FARMACOCINÉTICO PARCIAL DAS AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIO OBTIDA POR CLAE-EM/EM.....	71

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	DESCRIÇÃO DO PESO MOLECULAR, TEOR, LOTE E MARCA DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	36
TABELA 2 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA O MONITORAMENTO EM PLASMA DA SITAGLIPTINA E FLUCONAZOL (PADRÃO INTERNO).....	39
TABELA 3 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE SITAGLIPTINA E PADRÃO INTERNO NAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE....	43
TABELA 4 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	46
TABELA 5 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA.....	60
TABELA 6 –	RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO.....	63
TABELA 7 –	RECUPERAÇÃO DA SITAGLIPTINA E DO FLUCONAZOL OBTIDOS COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA E ÁCIDO FÓRMICO 1,0% (v/v).....	64
TABELA 8 –	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ.....	65
TABELA 9 –	ESTABILIDADE DA SITAGLIPTINA EM PLASMA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	67
TABELA 10 –	ESTABILIDADE DA SITAGLIPTINA E DO FLUCONAZOL EM SOLUÇÃO DE ÁGUA:ACETONITRILA (50:50, v/v), NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO.....	67
TABELA 11 –	CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE SITAGLIPTINA NAS AMOSTRAS DOS VOLUNTÁRIOS SUBMETIDOS AO ESTUDO FARMACOCINÉTICO.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	– Acetonitrila
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAD	– <i>Collisionlly Activated Dissosiation</i> / Gás de Colisão
CE	– <i>Collision Energy</i> / Energia de Colisão
CEP	– Potencial de Entrada na Cella de Colisão
CI	– <i>Clearance</i>
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	– Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas e Espectrometria de Massas Sequencial
CQA	– Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB	– Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQD	– Controle de Qualidade de Diluição
CQM	– Controle de Qualidade de Média Concentração
CUR	– <i>Curtain Gas</i> / Gás de Interface
CV	– Coeficiente de Variação
CXP	– <i>Collision Cell Exit Potential</i> / Potencial de Saída da Cella de Colisão
DC	– Corrente de Voltagem
DM	– Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	– Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	– Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DP	– Desvio Padrão
DP	– Potencial de Desagrupamento
DPP-4	– Dipeptidil peptidase IV
EM	– Espectrometria de Massas
EP	– <i>Entrance Potential</i> / Potencial de Entrada
EPR	– Erro Padrão Relativo
ESI	– <i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por Eletrospray
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FE	– Fase Estacionária
FF	– Forma Farmacêutica

FIA	– <i>Flow Infusion Analysis</i> / Análise por Infusão em Fluxo
FM	– Fase Móvel
FMN	– Fator de Matriz Normalizado
GIP	– Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose
GLP-1	– Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1
GS1	– <i>Nebulizer Gas</i> / Gás de Nebulização
GS2	– <i>Turbo Gas</i> / Gás Secante
HbA1C	– Hemoglobina Glicada
CQ-LIQ	– Controle de Qualidade do Limite Inferior de Quantificação
LSQ	– Limite Superior de Quantificação
m/z	– Relação Massa/Carga
MRM	– <i>Multiple Reaction Monitoring</i> / Monitoramento de Reação Multipla
PI	– Padrão Interno
QUALITEC	– Grupo de Pesquisa em Controle de Qualidade e Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Paraná
RDC	– Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	– Rotações por Minuto
SBD	– Sociedade Brasileira de Diabetes
SQR	– Substância Química de Referência
STG	– Sitagliptina
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
V	– Volts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
3.1	DIABETES.....	22
3.2	TRATAMENTO DE PACIENTES COM DIABETES <i>mellitus</i> 2.....	23
3.3	SITAGLIPTINA.....	25
3.3.1	Mecanismo de Ação.....	26
3.3.2	Farmacocinética.....	28
3.4	MÉTODOS BIOANALÍTICO APLICADOS EM ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS .....	29
3.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	29
3.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).....	31
3.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS.....	32
3.5.1	Controles de Qualidade.....	33
3.5.2	Seletividade .....	33
3.5.3	Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação.....	34
3.5.4	Curva de Calibração.....	34
3.5.5	Precisão e Exatidão.....	34
3.5.6	Recuperação .....	35
3.5.7	Efeito Matriz.....	35
3.5.8	Efeito Residual.....	35
3.5.9	Estabilidade .....	36
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	PADRÕES ANALÍTICOS, SOLVENTES E REAGENTES.....	37
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA.....	38
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO.....	38
4.4	INSTRUMENTAÇÃO.....	38



4.5	TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR O MELHOR PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA SITAGLIPTINA E DO PADRÃO INTERNO.....	40
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	41
4.6.1	Preparo de amostras fortificadas antes (FA).....	41
4.6.2	Preparo de amostras fortificadas depois (FD).....	42
4.6.3	Preparo de amostras branco.....	43
4.6.4	Preparo de amostras zero.....	43
4.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	44
4.7.1	Amostras de Controle de Qualidade.....	44
4.7.2	Seletividade .....	45
4.7.3	Limite Inferior de Quantificação.....	46
4.7.4	Curva de Calibração (Linearidade).....	46
4.7.5	Precisão e Exatidão.....	47
4.7.6	Recuperação .....	48
4.7.7	Efeito Matriz.....	49
4.7.8	Efeito Residual.....	49
4.7.9	Estabilidade .....	50
4.7.9.1	Estabilidade do analito em plasma.....	50
4.7.9.2	Estabilidade do analito e PI em solução.....	51
4.8	APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	51
4.8.1	Preparo de Amostra.....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM.....	53
5.2	TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO.....	57
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	58
5.3.1	Seletividade .....	58
5.3.2	Limite Inferior de Quantificação.....	61
5.3.3	Curva de Calibração.....	62
5.3.4	Precisão e Exatidão.....	64

5.3.5	Recuperação .....	67
5.3.6	Efeito Matriz.....	67
5.3.7	Efeito Residual.....	68
5.3.8	Estabilidade.....	69
5.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIOS.....	70
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
	<b>ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) pode ser caracterizado por um conjunto de distúrbios metabólicos, decorrente da hiperglicemia crônica, resultante dos defeitos de ação e excreção da insulina. A classificação do diabetes considera sua etiologia, dividindo-se em diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e gestacional. Dentre essa classificação, cerca de 90% dos indivíduos diagnosticados com DM são do tipo 2 (JONAS et al., 2011).

Quando não tratado, o diabetes pode gerar complicações irreversíveis como nefropatias, degeneração da retina, problemas vasculares e cerebrais. Essas complicações podem gerar altos custos hospitalares, por isso é essencial diagnosticar, tratar e acompanhar cada paciente (FERREIRA, 2011).

Para a escolha do tratamento farmacológico ideal no DM tipo 2, é necessário entender os mecanismos de resistência à insulina, falência de células  $\beta$  pancreáticas, outros distúrbios metabólicos, e também, a história natural do DM 2. Os fármacos, utilizados para diminuição e controle da glicemia, são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, divididos em: sulfonilureias, metiglinidas, biguanidas, inibidores da  $\alpha$  glicosidade, gliptinas, análogos do peptídeo semelhante ao glucagon, inibidores do cotransportador de sódio/glicose e gliptinas (SBD, 207).

As gliptinas são fármacos inibidores da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-4). Essa classe aumenta os níveis do peptídeo semelhante ao glucagon I (GLP-1), através da inibição da DPP-4. A grande concentração de GLP-1 eleva os níveis da síntese e secreção de insulina, além de reduzir a quantidade de glucagon. As principais vantagens destes fármacos estão relacionadas a sua margem de segurança e tolerabilidade, rara hipoglicemia e regeneração das células  $\beta$  (ALSALIM et al., 2018).

Disponível comercialmente no Brasil como Januvia<sup>®</sup>, este medicamento foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2009, e pode ser encontrada nas farmácias como ativo isolado (Januvia<sup>®</sup>) ou em associação com cloridrato de metformina (Janumet<sup>®</sup>). Essas duas apresentações estão na forma farmacêutica de comprimido oral. Levando em consideração as características fisiológicas e sociais dos pacientes com DM2, é necessário que sua apresentação seja cômoda para a administração, garantindo o sucesso da terapia.

Dessa forma, adaptar o tratamento utilizando como forma farmacêutica comprimidos orodispersíveis trazem maior comodidade ao paciente, uma vez que são

desintegrados rapidamente quando colocados sobre a língua (BRASIL, 2010). Visando a adesão terapêutica, o grupo de pesquisa QUALITEC, desenvolveu comprimidos orodispersíveis contendo sitagliptina.

Apenas modificar a forma farmacêutica (FF) pode não garantir o sucesso da terapia, caso a mudança não leve em consideração as características físico-químicas e farmacológica dos ativos. Por isso é necessário avaliar as diferenças entre as formulações e garantir sua bioequivalência. A farmacocinética pode ser usada como estudo comparativo para essas diferentes FF, para tanto é necessário utilizar metodologias analíticas de quantificação de fármacos em fluidos biológicos como saliva, sangue e urina (BRASIL, 2002; BRASIL, 2006; HIRANI; RATHOD; VADALIA, 2009).

Fármacos recém aprovados pela ANVISA e FDA geralmente não possuem métodos bioanalíticos descritos em compêndios oficiais, como é o caso da sitagliptina. Além disso é necessário adaptar os métodos já existentes para aplicabilidade em estudos farmacocinéticos. Assim, o presente trabalho visa desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para ser utilizada em estudos farmacocinéticos de formas farmacêuticas contendo sitagliptina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método bioanalítico utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas (EM) para a quantificação de sitagliptina em plasma humano.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir e otimizar o método de extração da sitagliptina em plasma humano.
- Desenvolver um método por CLAE-EM/EM, para a quantificação de sitagliptina, otimizando os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas.
- Validar o método desenvolvido, seguindo as normativas vigentes pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e normativas internacionais, como *Food and Drug Administration* (FDA).
- Aplicar o método desenvolvido e validado na quantificação da sitagliptina em plasma de voluntários.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DIABETES

O diabetes *mellitus* (DM) consiste em um grupo de doenças metabólicas, caracterizado pelo aumento da concentração sanguínea de glicose, relacionado a deficiência na produção e/ou ação da insulina (SBD, 2017).

A glicose é a fonte obrigatória de energia humana, seu controle fisiológico ocorre de acordo com a ingestão de alimentos e a demanda metabólica exigida pelo organismo. O principal hormônio controlador do metabolismo da glicose é a insulina. Quando a insulina não é produzida, não possui efeito, ou sua quantidade é insuficiente, provoca o diabetes *mellitus* (RANG et al., 2016; BRUTON; KNOLLMAN; CHABNER, 2018).

O DM pode ser classificado como diabetes gestacional, DM do tipo 1 ou DM do tipo 2. O DM gestacional é determinado pela intolerância à glicose, inicialmente diagnosticada durante a gravidez, podendo ou não persistir no pós-parto. Gestantes com DMG, apresentam alta probabilidade de desenvolver DM tipo 2 posteriormente (TRINDADE-SUEDAM et al., 2016).

O DM1 ocorre principalmente em crianças e adolescentes. Nesse tipo de DM, as células  $\beta$  pancreáticas sofrem destruição crônica devido a ação de mecanismos autoimunes (FERREIRA et al., 2011). Os pacientes com essa forma de diabetes dependem do uso da insulina, pois a perda de células  $\beta$  pancreáticas é grande o suficiente para não produzir a quantidade de insulina necessária (ADA, 2010).

A DM2 é a forma mais comum de diabetes, correspondendo a aproximadamente 90% dos casos, e atinge principalmente adultos. Esses pacientes não sofrem destruição das células  $\beta$  pancreáticas, porém, a insulina produzida pode não possuir ação ou a secreção não ser satisfatória, levando a resistência do que é produzido. Quando o paciente não é tratado corretamente, pode ocorrer falência progressiva de células  $\beta$  pancreáticas e a dependência de insulina (FRÁGUAS; SOARES; BRONSTEIN, 2009).

Adultos com DM2 possuem alto risco de desenvolver diversas complicações como a cetoacidose diabética e o estado hiperosmolar hiperglicêmico, que são complicações agudas e reversíveis. Já as complicações crônicas podem ser

irreversíveis, como doença arterial crônica, acidente vascular cerebral, sobrepeso e obesidade, disfunção e falência de órgãos (rins, olhos, coração, nervos e vasos sanguíneos), ocasionando doenças neuropáticas, cardíacas e infecciosas (PINHAS-HAMIEL; ZEITLER, 2007; FRÁGUAS; SOARES; BRONSTEIN, 2009; ARIZA; VIMALANANDA; ROSENZWEIG, 2010; RAMOS; FERREIRA, 2011).

O diagnóstico laboratorial do DM2 baseia-se nos seguintes critérios:

- Glicemia casual: superior a 200 mg/dL;
- Glicemia em jejum: superior a 126 mg/dL;
- Glicemia após duas horas de sobrecarga de 75 gramas de glicose: superior a 200 mg/dL.

Para o acompanhamento glicêmico, a hemoglobina glicada (HbA1C) é considerada padrão-ouro, pois reflete a glicose plasmática média dos últimos 120 dias. A HbA1C também pode ser considerada como critério de diagnóstico, quando superior a 6,5% (ADA, 2010, 2015; SBD, 2017).

O diabetes é a doença crônica com maior ascensão em todo o mundo, a Federação Internacional de Diabetes estimou que em 2019 mais de 463 milhões de pessoas vivam com diabetes e que a prevalência seja de 9,3% na população mundial entre 20 e 79 anos (FID, 2019). A crescente prevalência do DM nos últimos anos pode ser explicada por diversos fatores, como alta frequência de sobrepeso, transição nutricional, estilo de vida mais sedentário, envelhecimento populacional e principalmente ao aumento da sobrevivência desses indivíduos. Com o aumento da prevalência da doença, há constante preocupação dos sistemas de saúde, uma vez que, quando não diagnosticada, tratada e acompanhada a progressão da doença no indivíduo, esse pode gerar altos custos hospitalares em decorrência das complicações que ela traz. Para o tratamento eficaz, é necessária uma mudança nos hábitos de vida, acompanhado de ação farmacológica (SBD, 2017).

### 3.2 TRATAMENTO DE PACIENTES COM DIABETES *mellitus* 2

O tratamento antidiabético tem como objetivos melhorar a qualidade de vida do paciente e prevenir complicações causadas pela hiperglicemia crônica. Para garantir melhoria na qualidade de vida do paciente é necessário que o tratamento não apresente efeitos indesejáveis como hipoglicemia ou ganho de peso. Com a redução

dos níveis de glicose e hemoglobina glicada, o risco de complicações cardiovasculares, neurológicas e nefropáticas também é diminuído. Além de corrigir a hiperglicemia, é necessário favorecer a abordagem de múltiplos riscos, como dislipidemia e hipertensão arterial (HALIMI, 2014; HOLMAN; SOURIRI; CALIFF, 2014; SCHEEN; CHARBONNEL, 2014).

Pacientes diagnosticados com DM2, trazem variadas apresentações clínicas iniciais da doença, bem como, diferentes cursos de progressão e resposta ao tratamento anti-hiperglicêmico. Mudanças no estilo de vida, incluindo prescrição de atividade física adequada e novos hábitos alimentares, são fundamentais para o tratamento. Porém, somente essas mudanças podem ser insatisfatórias, sendo indicado o uso de farmacoterapia (BLONDE, 2010). Devido a essas características individuais, a escolha do tratamento deve considerar o contexto das necessidades, preferências e tolerância de cada paciente, levando o prescritor a individualizar o tratamento para obtenção do sucesso (INZUCCHI et al., 2012).

O tratamento farmacológico do DM2 utiliza medicamentos hipoglicemiantes orais, também chamados antidiabéticos orais. O desenvolvimento desses medicamentos ocorreu em duas grandes ondas. A primeira ocorreu no final da década de 1950, quando as biguanidas e sulfonilureias passaram a ser comercializadas. Mais de seis décadas depois, essas classes de medicamentos continuam sendo líderes de venda no mercado, podendo destacar a metformina, que é o antidiabético oral de primeira linha. A segunda onda apareceu somente no início dos anos 2000 quando se deu início a comercialização de tiazolidinedionas ou glitazonas, inibidores da dipeptidilpeptidase-IV (DPP-4) ou gliptinas e, recentemente, inibidores dos co-transportadores de sódio-glicose tipo 2 ou gliflozinas (INZUCCHI et al., 2012; SCHEEN, 2015).

No Brasil, nove classes de antidiabéticos estão disponíveis comercialmente. A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), classifica os antidiabéticos orais em categorias:

- a) Agentes que aumentam a secreção de insulina: sulfonilureias (clorpropamida e glibenclamida) e glinidas (repaglinida e nateglinida);
- b) Agentes que não aumentam a secreção de insulina: inibidores da  $\alpha$ -glicosidade (arcabose), biguanidas (metformina) e glitazonas (pioglitazona);



- c) Agentes que aumentam a secreção de insulina dependente de glicose e que diminuem a secreção de glucagon: gliptinas (sitagliptina e vildagliptina), miméticos do GLP-1 (exenatida) e análogos do GLP-1 (liraglutida e lixisenatida);
- d) Agentes que promovem glicosúria: inibidores do cotransportador de sódio-glicose (dapagliflozina e empagliflozina).

### 3.3 SITAGLIPTINA

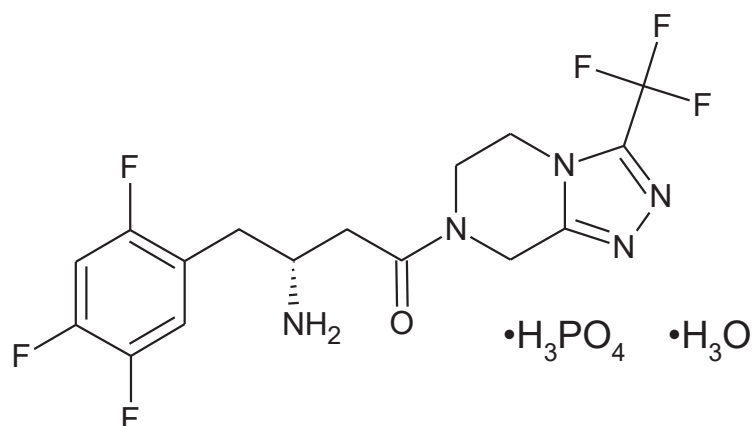
A Sitagliptina é um fármaco anti-hiperglicêmico oral, altamente seletiva que pertence à classe dos inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), utilizada como complemento à dieta e exercícios físicos no tratamento da DM2 (GREEN et al., 2015; BERGER et al., 2018).

A sitagliptina foi o primeiro inibidor da DPP-4 aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e está disponível comercialmente na forma de sal fosfatado. O medicamento referência é produzido e comercializado pela Merck Sharp & Dohme, com o nome comercial Januvia®. No Brasil é aprovado pela ANVISA e comercializado desde 2009. Em seguida, outros fármacos inibidores da DPP-4 também foram aprovados, como a vildagliptina, saxagliptina, alogliptina e a linagliptina (DOGGRELL; DIMMITT, 2016).

Também conhecida como fosfato de sitagliptina monoidratado, a sitagliptina é descrita quimicamente como 7 - [(3R) - 3 - amino - 1 - oxo - 4 - (2, 4, 5 - trifluorfenil) butil] 5, 6, 7, 8 - tetrahydro - 3 - (trifluorometil) - 1, 2, 4 - triazol [4, 3 - a] pirazina (LOTFY; MOHAMED; MOWAKA, 2015), conforme demonstrado na FIGURA 1. Sua fórmula molecular é  $C_{16}H_{15}F_6N_5O \cdot H_3PO_4 \cdot H_2O$ , com peso molecular de 532,23 Da quando fosfatada e mono hidratada e 407,13 Da quando isolada (ZERILLI; PYON, 2007).

O fosfato monoidratado de sitagliptina é caracterizado como um pó branco cristalino e não higroscópico. É solúvel em água e N, N-dimetilformamida, ligeiramente solúvel em metanol e pouco solúvel em acetonitrila, etanol e acetona (SIRIGIRI; SUBRAMANIAM; REDDY, 2018).

FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DO FOSFATO MONOIDRATADO DE SITAGLIPTINA



FONTE: O Autor (2020).

### 3.3.1 Mecanismo de Ação

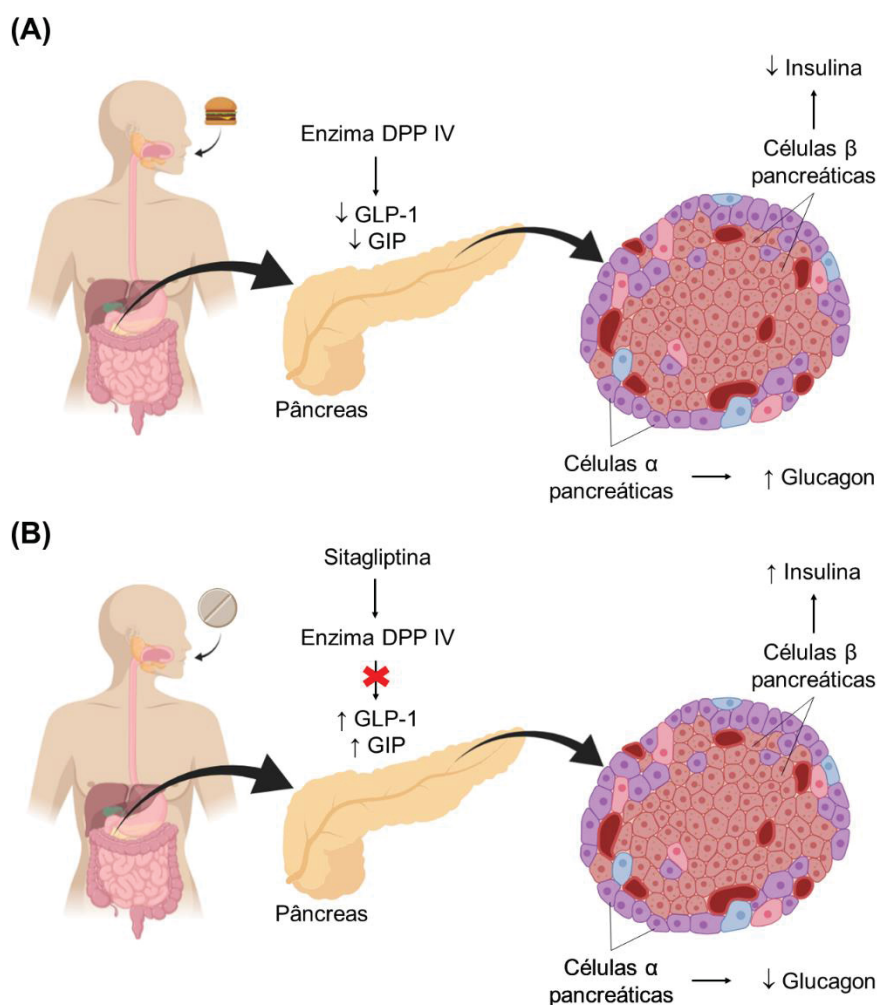
O mecanismo de ação da sitagliptina está relacionado com a modulação dos níveis do peptídeo insulínico dependente de glicose<sup>1</sup> (GIP) e do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), através da inibição da enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP-4) (ZERILLI; PYON, 2007).

A DPP-4 pode ser encontrada em toda a circulação sanguínea, sendo o GIP e o GLP-1 únicos substratos da enzima em humanos. Por se tratar de um membro da família das endopeptidases, sua ação ocorre de maneira rápida, clivando preferencialmente os peptídeos com aminoácidos alanina ou prolina na posição 2 N terminal da cadeia peptídica (THORNBERRY; GALLWITZ, 2009).

Os peptídeos GIP e GLP-1 são secretados pelo intestino delgado, em resposta a ingestão de alimentos, e estão sujeitos a rápida degradação pela enzima DPP-4. Esses peptídeos estimulam a secreção de insulina, a expressão de seu gene, o desenvolvimento de células  $\beta$ -pancreáticas e como consequência a supressão da secreção de glucagon. Ao administrar um inibidor da DPP-4, ocorre o aumento das concentrações de GIP e GLP-1 (BÖSENBERG; VAN ZYL, 2008), conforme demonstrado na FIGURA 2.

<sup>1</sup> GIP, anteriormente chamado de peptídeo inibitório gástrico (BÖSENBERG; VAN ZYL, 2008).

FIGURA 2 - MECANISMO DE AÇÃO DA SITAGLIPTINA



FONTE: O Autor (2020)

LEGENDA: (A) Estado pós prandial em pacientes diabéticos não tratados; (B) Estado pós prandial em tratamento com sitagliptina; DPP IV: Dipeptidil Peptidase 4; GLP-1: Peptídeo Semelhante ao Glucagon-1; GIP: Peptídeo Insulinotrópico Dependente de Glicose.

Com o aumento desses peptídeos ocorre a ativação de receptores de GIP e GLP-1, nas células β-pancreáticas, aumento dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e cálcio intracelular. Conseqüentemente ocorre a secreção da insulina dependente de glicose, a inibição da secreção de glucagon e a captação celular de glicose (ZERILLI; PYON, 2007; GUPTA; KALRA, 2011, SBD, 2017).

Pacientes com DM2 apresentam, no estado pós-prandial, diminuição dos níveis de GLP-1, favorecendo a redução dos estímulos fisiológicos para a secreção de insulina e supressão de glucagon. Por isso, o uso dessa classe de inibidores pode

aumentar em até três vezes a quantidade de GLP-1 ativo (BÖSENBERG; VAN ZYL, 2008; SBD, 2017).

Devido ao seu mecanismo de ação, é recomendada no tratamento de pacientes com DM2. Pode ser utilizado em monoterapia ou associado a outros fármacos antidiabéticos como metformina, sulfonilureias, glitazonas e até mesmo a insulina. Sua utilização em monoterapia pode favorecer a redução da HbA1c entre 0,6 e 1,0% e não geram efeitos sobre o peso do indivíduo (BÖSENBERG; VAN ZYL, 2008; THORNBERRY; GALLWITZ, 2009; SBD, 2017).

### 3.3.2 Farmacocinética

Foram publicados diferentes estudos caracterizando as propriedades farmacocinética da sitagliptina, em humanos e animais, indivíduos saudáveis ou com alterações metabólicas, no uso monoterápico ou combinado com outros medicamentos (HERMAN et al., 2005; BERGMAN et al., 2006; BECONI et al., 2007; BERGMAN et al., 2009; ARUN et al., 2012; KIM et al., 2013; SANGLE et al., 2018).

No geral, após a administração oral, a sitagliptina é rapidamente absorvida, com pico de concentração plasmática entre 1 e 4 horas, biodisponibilidade de aproximadamente 87% e meia vida de eliminação próxima a 12 horas (SHAKYA, 2015; SBD, 2017). Cerca de 79% da sitagliptina é excretada na urina e 13% nas fezes, ambas de forma inalterada (MSD, 2014). Apesar de ser possível encontrar diferentes metabólitos, em nível residual, não estão relacionados com a atividade inibidora da DPP-4 (LIU et al., 2007; MSD, 2014).

Em 2005, Herman e colaboradores realizaram um estudo farmacocinético a fim de verificar as interações entre sitagliptina e alimentação. Enquanto um grupo recebia uma dieta rica em gordura (com ovos, bacon, bata frita, pão com manteiga e leite integral), o grupo controle recebeu uma dieta balanceada (frango grelhado, macarrão, azeite de oliva, pêssigo e água). Apesar dessa grande diferença de alimentação, entre os indivíduos saudáveis não houve diferença significativa entre os resultados, permitindo então, o uso da sitagliptina em qualquer estado de alimentação.

Por se tratar de um fármaco com alta solubilidade, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), os excipientes escolhidos para sua formulação podem interferir no perfil de dissolução, com consequências diretas na

absorção do fármaco e sua farmacocinética (SHAKYA, 2015). Apesar dessa variedade de estudos, não foram encontradas comparações entre diferentes formulações ou formas farmacêuticas contendo sitagliptina, sendo assim necessário e inovador realizar estudos comparativos.

Para a realização de estudos farmacocinéticos, é necessário utilizar metodologias de quantificação de fármacos e seus metabólitos, sensíveis o suficiente para detectá-los em meio a matrizes complexas e cheias de interferentes, preciso e exato para indicar os verdadeiros valores de concentração em múltiplas amostras. Por isso é fundamental a correta escolha de técnicas e equipamentos. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas possui as características necessárias para ser utilizada nesse tipo de estudo.

### 3.4 MÉTODOS BIOANALÍTICO APLICADOS EM ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS

#### 3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas de separação mais utilizada das últimas décadas. Por sua ampla aplicabilidade, pode ser utilizada em laboratórios industriais, químicos, farmacêuticos, ambientais, toxicológicos e médicos (MALDANER; JARDIM, 2009; VOGESER; SEGER, 2012; MOGOLLÓN et al., 2014).

As primeiras colunas de cromatografia líquida continham em seu interior (recheio) partículas irregulares, com aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diâmetro, eram longas e necessitavam de uma grande quantidade de fase móvel para promover a correta separação dos compostos. A popularização do uso da CLAE foi permitida através dos avanços tecnológicos aplicados a técnica. Com a padronização e diminuição dos tamanhos de partícula, chegando a 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro ou menor, as separações cromatográficas obtiveram melhores desempenhos, reprodutibilidade e resolução, bem como menor tempo de análise, gasto de solvente, sem a perda de eficiência (MALDANER; JARDIM, 2009; LOOS; SCHEPDAEL; COBOOTER, 2016).

Os princípios de separação em cromatografia líquida são relacionados as características físico-químicas das amostras e sua interação com a fase móvel (FM) e

com a fase estacionária (FE) da coluna. Durante a corrida cromatográfica, os analitos presentes na amostra ficam distribuídos tanto na fase móvel quanto na fase estacionária. A retenção na fase estacionária ocorre de acordo com as interações entre ela e os analitos, como cada analito interage de diferentes maneiras, a migração de cada um para fora da coluna acontece individualmente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

É possível classificar as técnicas cromatográficas de acordo com o mecanismo de interação responsável pela separação dos analitos, como adsorção, troca iônica e exclusão. Na adsorção, a FE possui grupos adsorventes quimicamente ligados, que interagem com os analitos por atrações dipolares, ligações de hidrogênio ou por dipolos induzidos. Quanto maior a atração entre analito e FE, maior é o tempo de retenção na coluna. Já a retenção por troca iônica se dá pela interação entre os grupos funcionais ionizáveis presentes na FE e na amostra. Esse mecanismo de separação é dependente de pH, por isso é fundamental acompanhar a concentração de contra-íons presente na FM, garantindo correta eluição da amostra (CASS; DEGANI, 2001; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Diferentemente da separação por adsorção e troca iônica, que depende de características físico-químicas, o mecanismo de separação por exclusão é basicamente mecânico. Sua FE com matriz inerte e porosa permite a passagem dos analitos de acordo com seu tamanho molecular, quanto menor for o tamanho, mais tempo permanecerá percorrendo os poros da FE, maior tempo de retenção (CASS; DEGANI, 2001; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Outro fator a ser levado em consideração na separação de analitos é a escolha da FM. A diferença entre a polaridade da FE e da FM determinará se a corrida cromatográfica é de fase normal (com FE mais polar que FM) ou de fase reversa (FE menos polar que FM). Separações de fase normal demandam grande uso de solventes extremamente polares, que podem ser tóxicos ao operador e ao meio ambiente. Em contrapartida, a fase reversa permite o uso de solventes mais limpos como água, etanol, metanol e acetonitrila. Em CLAE, a fase reversa se torna uma das técnicas mais utilizadas, devido as suas vantagens em relação a FM e por poder ser executada com menor tempo e custo de análise (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; TONHI et al, 2002).

Além da separação dos analitos nas amostras testadas, é oportuno realizar a quantificação de cada um, separadamente. Para tanto, é necessário a presença de

um detector, capaz de medir as mudanças na concentração de acordo com o que elui da coluna cromatográfica. Para estudos em CLAE é possível acoplar detectores eletroquímicos, de fluorescência, índice de refração, espalhamento de luz, arranjo de diodos (DAD), Ultravioleta-visível e espectrômetro de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; MALDANER; JARDIM, 2009; LOOS; SCHEPDAEL; COBOOTER, 2016).

### 3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM)

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que consiste na ionização molecular, formando íons carregados positiva ou negativamente, detectados de acordo com sua razão massa/carga ( $m/z$ ). A técnica pode ser aplicada tanto para identificação quanto para quantificação de compostos. Para realização da técnica é utilizado um espectrômetro de massas, que é formado por fonte de ionização, analisador de massas e detector (HERNANDEZ; SANCHO; POZO, 2005; LIM et al, 2002).

As fontes de ionização mais utilizadas em CLAE-EM (acoplamento de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas) são a ionização por *Electrospray* (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI). As duas fontes permitem a formação de íons  $[M+H]^+$  no modo positivo e  $[M+H]^-$  no modo negativo (YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009; POMILIO; BERNATENÉ; VITALE, 2011).

Na ESI, a amostra em estado líquido, junto a fase móvel, é injetada a um capilar com alta voltagem. A eletropulverização da amostra é acionada por alta tensão (2 – 6 kV) ao sair do capilar. Assim é criado um *spray* carregado eletricamente, que em seguida é dessolvatado em gotículas. A dessolvatação permite que as gotículas formadas possuam carga suficiente para ultrapassar a própria tensão superficial, explodindo e liberando os íons formados para o interior do analisador, atraídos pela eletrostática e vácuo (LIM; LORD, 2002; YATES; RUSE; NAKORCHEVSKY, 2009; POMILIO; BERNATENÉ; VITALE, 2011).

Após sua produção, os íons são separados nos analisadores segundo a relação  $m/z$ . Os analisadores podem ser divididos em analisadores de captura e de

transmissão. Nos analisadores de captura, os íons são armazenados no campo eletromagnético, permitindo a avaliação e injeção em outras fontes. como o analisador ICR (ressonância ciclôtrica de íons) (LOOS; SCHEPDAEL; COBOOTER, 2016; HAAG, 2016).

Já nos analisadores de transmissão, os íons percorrem um campo eletromagnético e chegam no analisador. O analisador mais popular dessa classe é o quadrupolo, que consiste num sistema de quatro cilindros metálicos em paralelo, em que se aplica uma corrente elétrica e um potencial de radiofrequência (LOOS; SCHEPDAEL; COBOOTER, 2016; HAAG, 2016).

Os analisadores do tipo triplo quadrupolo utilizam um conjunto de quadrupolos com diferentes funções. O primeiro quadrupolo direciona os íons precursores a uma câmara de colisão, que ao se chocarem com um gás inerte, como o nitrogênio, formam íons fragmentos. O monitoramento de íons fragmentados torna o método ainda mais específico, uma vez que cada fragmento só é formado mediante a um específico precursor (DOOLEY, 2003; HAAG, 2016).

Após a passagem pelo analisador, finalmente os íons chegam ao detector produzindo um sinal a partir dos fragmentos gerados, que são amplificados. Os detectores podem ser multiplicadores de fótons ou de elétrons, sendo o de elétrons o mais utilizado (LANÇAS, 2009).

### 3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A validação de métodos bioanalíticos é essencial para garantir qualidade analítica. A resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária caracteriza métodos bioanalíticos como sendo aqueles utilizados na determinação quantitativa de analitos em matrizes biológicas.

Os parâmetros utilizados na validação de métodos bioanalíticos, de acordo com a resolução RDC nº 27/2012 da ANVISA e do guia internacional para validação de ensaios bioanalíticos da FDA de 2018 são: seletividade, limite de detecção e limite inferior de quantificação, curva de calibração, precisão, exatidão, ; efeito residual, efeito matriz, , estabilidade do analito em matriz biológica, recuperação,.



### 3.5.1 Controles de Qualidade

Amostras de controle de qualidade consistem em amostras da matriz biológica fortificadas em concentrações conhecidas do analito e padrão interno (PI), com o objetivo de monitorar o desempenho do método bioanalítico, avaliar a integridade e validade dos resultados fornecidos por amostras com concentrações desconhecidas (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

As amostras de controle de qualidade em métodos bioanalíticos são:

- Controle de qualidade de baixa concentração (CQB): amostra de matriz biológica adicionada de analito em concentração até três vezes o limite de quantificação e PI.
- Controle de qualidade de média concentração (CQM): amostra de matriz biológica adicionada de analito em concentração próxima à média entre os limites inferior e superior de quantificação e PI.
- Controle de qualidade de alta concentração (CQA): amostra de matriz biológica adicionada de analito em concentração com valor entre 75 - 85% da maior concentração da curva de calibração e PI.
- Controle de qualidade de diluição (CQD): amostra de matriz biológica adicionada de analito em concentração que ultrapassa o limite superior de quantificação, analisada por meio de diluição especificada no método e PI.
- Controle de qualidade limite inferior de quantificação (CQ-LIQ): amostra de matriz biológica adicionada de analito na menor concentração da curva de calibração e PI.

### 3.5.2 Seletividade

Considerado o primeiro parâmetro a ser avaliado na validação de um método, a seletividade consiste na capacidade do método de identificar e quantificar o analito em estudo na presença de outros componentes que possam estar presentes na amostra biológica (degradantes, metabólitos, medicamentos e outros componentes da matriz). A seletividade garante que os resultados obtidos não são afetados pela presença de interferentes na amostra (LA ROCA et al., 2007; BRASIL, 2012).

### 3.5.3 Limite de Detecção e Limite Inferior de Quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade de analito que pode ser detectada com confiabilidade, mas não quantificada como um valor exato pelo método, ou seja, consiste na menor quantidade que pode ser confiavelmente distinguida do ruído de fundo no procedimento bioanalítico (ARAUJO, 2009).

Já o limite inferior de quantificação (LIQ) é estabelecido como a menor concentração do analito na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2012).

### 3.5.4 Curva de Calibração

A curva de calibração representa a capacidade do procedimento bioanalítico em confirmar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, o que também pode ser chamado de linearidade (FDA, 2018).

Com base nessa característica de linearidade e a aplicação pretendida para o método, pode-se estabelecer o intervalo específico para a curva de calibração (entre o limite inferior e superior de quantificação) com precisão e exatidão (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

A curva de calibração deve ser construída para cada analito e leitura analítica, usando a mesma matriz biológica do estudo. Cada curva deve incluir a análise de amostra branco: matriz biológica sem analito PI; amostra zero: matriz biológica com PI; e cinco amostras de cada controle de qualidade (CQs) contendo PI e o analito em concentrações pré-estabelecidas (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

### 3.5.5 Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de concordância entre valores obtidos por repetição de um procedimento experimental, sob condições específicas. Esse parâmetro é necessário para avaliar os erros aleatórios do método, de modo a serem insignificantes na obtenção dos resultados. Quanto maior a proximidade dos

resultados, mais preciso é o método. O resultado é expresso por meio do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

Já a exatidão está relacionada com o grau de concordância dos resultados obtidos em relação ao seu valor de referência. Quanto maior a proximidade dos resultados experimentais com o valor de referência, maior é a exatidão do método. Este ensaio é expresso pelo erro padrão relativo (EPR) (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

### 3.5.6 Recuperação

O parâmetro de recuperação mede a eficiência do processo em extrair o analito da matriz biológica, ou seja, avalia a capacidade do método de preparo de amostra em extrair o analito de uma matriz complexa. Este parâmetro corresponde à porcentagem do analito extraído em matriz fortificada nos diferentes níveis de concentração, dentro de um limite de variação. É desejável atingir valores próximos a 100% de recuperação, mas valores menores podem ser aceitos desde que a recuperação seja precisa e exata (FDA, 2018).

### 3.5.7 Efeito Matriz

O estudo de efeito matriz é realizado a fim de evitar falsos resultados gerados pela leitura de componentes residuais da matriz junto com o analito, uma vez que a co-leitura pode elevar a intensidade de sinal ou suprimi-lo (BRASIL, 2012; DURVE; NAIK, 2014).

### 3.5.8 Efeito Residual

O efeito residual é gerado pela contaminação resultante da análise de amostras anteriores, sendo observado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito. Por isso, é crucial garantir que análises anteriores não comprometam os

resultados das subsequentes (BRASIL, 2012; VIEIRA; REDIGUIERI; REDIGUIERI, 2013).

### 3.5.9 Estabilidade

As características físico-químicas dos fármacos influenciam diretamente em sua estabilidade em matrizes biológicas e em solução. O uso de medicamentos concomitantes também pode interferir na estabilidade do fármaco/analito a ser quantificado. Assim, é necessário conhecer o comportamento do analito, em meio a outras substâncias e condições de armazenamento, para garantir resultados confiáveis. Para isso, são realizados testes que reproduzem diferentes condições de armazenamento, preparo e processamento das amostras, utilizando um conjunto de matriz biológica fortificada com o PI e analitos, assim como padrões em solução (CASSIANO et al., 2009; BRASIL, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PADRÕES ANALÍTICOS, SOLVENTES E REAGENTES

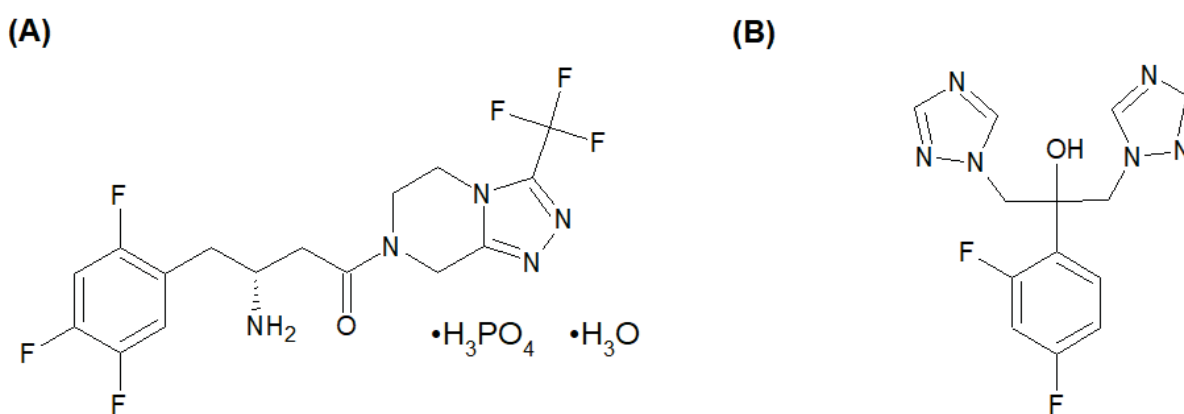
Os padrões analíticos são apresentados na TABELA 1, com a descrição de suas características (peso molecular, teor, lote e marca). O fluconazol foi utilizado como padrão interno, pois possui grupamentos moleculares e características físico-químicas semelhantes aos presentes na sitagliptina, conforme pode ser observado na FIGURA 3.

TABELA 1 – DESCRIÇÃO DO PESO MOLECULAR, TEOR, LOTE E MARCA DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Analito	Peso molecular	Teor (%)	Lote	Marca
Fluconazol	306,27 g/mol	98,0	02	European Pharmacopoeia
Fostato Monoidratado de Sitagliptina	523,32 g/mol	96,4	01	European Pharmacopoeia

FONTE: O autor (2020).

FIGURA 3 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DA SITAGLIPTINA E DO FLUCONAZOL



FONTE: O autor (2020).

NOTA: (A) Fórmula estrutural do Fostato Monoidratado de Sitagliptina; (B) Fórmula estrutural do Fluconazol.

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento e validação do método foram: acetonitrila (J.T. Barker®, New Jersey, EUA), metanol (J.T. Barker®, New Jersey, EUA), ácido fórmico (J.T. Barker®, New Jersey, EUA), formiato de amônio

(Spectrum Chemical, Gardena, EUA) e a água ultrapura foi obtida através do Sistema de Purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Milford, EUA)

#### 4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA

As amostras de plasma hemolisado (plasma contendo hemácias lisadas), plasma lipêmico (plasma pós-prandial 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 pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar, Curitiba, Brasil).

#### 4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO

Para o preparo das soluções estoque de sitagliptina e PI, foram pesados as substâncias químicas de referência descritas na TABELA 1 em balança analítica Mettler Toledo (modelo Excellence Plus XP, Columbus, EUA). Em seguida, os padrões foram dissolvidos em acetonitrila:metanol, 50:50 (v/v), obtendo concentração final de 1mg/mL. Ambas soluções estoque foram armazenadas em *freezer* a -40 °C.

A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho através de diluições apropriadas com acetonitrila:água 50:50 (v/v). As soluções de trabalho de sitagliptina foram preparadas nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL enquanto que as soluções de trabalho do PI foram preparadas nas concentrações de 100 µg/mL e 10 µg/mL.

#### 4.4 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram executadas em um cromatógrafo a líquido Agilent<sup>®</sup> 1200 (Wilmington, EUA) composto por bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B. Conectado ao sistema, o gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation<sup>®</sup>, Milford, EUA) foi mantido a 4 °C durante as análises. Acetonitrila e metanol (50:50, v/v) foram utilizados como solvente de limpeza da agulha entre as injeções.

O sistema de CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo (API 3200, Applied Biosystems®, Toronto, Canada), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus®, South Natick, EUA) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o monitoramento em plasma da sitagliptina e fluconazol (PI) foram ajustados os seguintes parâmetros cromatográficos e espectrométricos:

- Fase móvel: (A) água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), eluída em modo gradiente:
  - Tempo 0 - 0,50 min: 10% a 50% B;
  - Tempo 0,50 - 2,00 min: 50% B;
  - Tempo 2,00 - 2,01 min: 50% - 10% B;
  - Tempo 2,01 - 5,00 min: 10% B;
- Fluxo da fase móvel: 300 µL/min;
- Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 2,1 x 50 mm, 3,5 µm de partícula;
- Pré-coluna: Eclipse Plus C18, 2,1 x 12,5 mm, 5 µm de partícula;
- Temperatura de forno da coluna: 35 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Fonte de ionização: ESI com modo positivo de ionização;
- Parâmetros da fonte de ionização:
  - *Curtain gas* (CUR): 18 psi;
  - *Collision gas* (CAD): 8 psi;
  - *Ionspray voltage* (IS): 5500 V;
  - Temperatura: 600 °C;
  - *Ion source gas 1* (GS1): 40 psi;
  - *Ion source gas 2* (GS2): 45 psi;
- Aquisição dos dados: Monitoramento de reações múltiplas (MRM) com *dwell time* de 300 ms;
- Posição de capilar: 10 mm vertical e 5 mm horizontal para infusão, 3 mm vertical e 5 mm horizontal para as análises CLAE-EM/EM;
- Parâmetros individuais e transições monitoradas: conforme descrito na TABELA 2.

TABELA 2 - ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA O MONITORAMENTO EM PLASMA DA SITAGLIPTINA E FLUCONAZOL (PADRÃO INTERNO)

Composto	Massa Molecular (Da)	Íon Molecular [M + H] <sup>+</sup> (m/z)	Transições (m/z)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
Sitagliptina	408,1	409,1	409,1→193,2	31	9	18	29	4
			409,1→235,2*	36	4,5	20	23	4
Fluconazol	307,1	308,1	308,1→220,2	26	6,5	16	21	4
			308,1→238,1*	26	6,5	16	19	4

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: DP: potencial de desagrupamento; EP: potencial de entrada; CEP: potencial de entrada na cela de colisão; CE: energia de colisão; CXP: potencial de saída da cela de colisão. \* Transição utilizada para quantificação.

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 do espectrômetro de massas foram adquiridos e processados com o software Analyst® 1.4 (ABI/Sciex).

#### 4.5 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR O MELHOR PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DA SITAGLIPTINA E DO PADRÃO INTERNO

Com o propósito de avaliar a melhor forma de extração da sitagliptina no plasma, diferentes agentes precipitantes foram testados no método de extração por precipitação de proteínas: metanol, metanol com 1,0% (v/v) de ácido fórmico, acetonitrila e acetonitrila com 1,0% (v/v) de ácido fórmico. Os testes foram realizados em quadruplicata para cada agente precipitante.

As alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram fortificadas com 20 µL de solução de sitagliptina 2500 ng/mL e 20 µL de solução de PI 1000 ng/mL. As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 1 minuto.

Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de cada agente precipitante e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Em seguida, 800 µL do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).



O resíduo remanescente foi ressuspendido com 100 µL de metanol e 100 µL de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

Para calcular a recuperação de cada agente precipitante, foram preparadas amostras fortificadas depois (FD). Nessas amostras as alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram adicionados 40 µL de diluente (acetonitrila:água, 50:50, v/v). As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 1 minuto.

Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de cada agente precipitante e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Em seguida, 800 µL do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuspendido com 80 µL de metanol, 80 µL de acetonitrila, 20 µL de solução de sitagliptina 2500 ng/mL e 20 µL de solução de PI 1000 ng/mL e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

A eficiência dos solventes precipitantes foi estabelecida com base na comparação entre as áreas dos picos cromatográficos das amostras fortificadas depois (considerado 100%) com as amostras fortificadas antes. Foi selecionado o procedimento de extração que apresentou maior recuperação e reprodutibilidade.

## 4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO

### 4.6.1 Preparo de amostras fortificadas antes (FA)

Alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram fortificadas com 20 µL de solução de trabalho de sitagliptina e 20 µL

de solução PI 1000 ng/mL, nas concentrações adequadas a obter os controles de qualidade e/ou curva de calibração, de acordo com a necessidade de cada requisito da validação.

As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de acetonitrila e ácido fórmico 1,0% (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após, 800 µL do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuspendido com 100 µL de metanol e 100 µL de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

#### 4.6.2 Preparo de amostras fortificadas depois (FD)

Alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram adicionadas de 40 µL de solução diluente de acetonitrila:água (50:50, v/v). As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de acetonitrila e ácido fórmico 1,0% (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após, 800 µL do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuspendido com 80 µL de metanol e 80 µL de acetonitrila, 20 µL de solução de PI 1000 ng/mL e 20 µL de solução de sitagliptina nas concentrações adequadas a obter os controles de qualidade e/ou curva de calibração, de acordo com a necessidade de cada requisito da validação.

As amostras foram submetidas ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

#### 4.6.3 Preparo de amostras branco

Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram adicionadas de 40  $\mu\text{L}$  de solução diluente de acetonitrila:água (50:50, v/v). As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760  $\mu\text{L}$  de acetonitrila e ácido fórmico 1,0% (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após, 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de metanol e 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

#### 4.6.4 Preparo de amostras zero

Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram adicionadas de 20  $\mu\text{L}$  de solução diluente de acetonitrila:água (50:50, v/v) e 20  $\mu\text{L}$  de solução de PI 1000 ng/mL. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760  $\mu\text{L}$  de acetonitrila e ácido fórmico 1,0% (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após, 800  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de metanol e 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

## 4.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

O método de quantificação da sitagliptina em plasma por CLAE/EM-EM foi validado de acordo com os critérios da RDC 27/2012 da ANVISA e pelo guia para validação de ensaios bioanalítico da FDA de 2018. De acordo com esses guias, o método bioanalítico deve atender aos requisitos dos seguintes parâmetros de validação: seletividade, limite inferior de quantificação, curva de calibração, precisão, exatidão, recuperação, efeito matriz, efeito residual, estabilidade do analito em matriz biológica, estabilidade do analito e PI em solução.

### 4.7.1 Amostras de Controle de Qualidade

Para avaliar o desempenho do método bioanalítico, foram preparadas amostras de controle de qualidade CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Todos os controles foram preparados em quintuplicatas. As amostras de CQD foram definidas como 10 vezes a concentração do ponto intermediário da curva (CQM), obtendo assim uma concentração maior que o LSQ.

TABELA 3 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE SITAGLIPTINA E PADRÃO INTERNO NAS AMOSTRAS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Analito	Amostras de controle de qualidade	Concentração (ng/mL)
Sitagliptina	CQ-LIQ	1,5
	CQB	5,0
	CQM	200
	CQA	400
	CQD	2000
Fluconazol (PI)	-	100

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: 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; PI: Padrão interno.

O preparo das amostras CQ-LIQ, CQB, CQM, CQA ocorreu conforme descrito no item 4.6.1 com a fortificação utilizando solução de sitagliptina 15 ng/mL, 50 ng/mL, 2000 ng/mL e 4000 ng/mL para cada controle, respectivamente.

Já o preparo das amostras do CQD ocorreu pela fortificação de alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram fortificadas

com 20 µL de solução de sitagliptina 20000 ng/mL. As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Logo depois, as amostras foram diluídas com plasma branco (1:10). Novamente essas amostras foram submetidas ao vórtex por 3 minutos. Dessa diluição, foram retiradas alíquotas de 200 µL de plasma e em seguida, adicionados 20 µL de solução do padrão interno e 20 µL de solução diluente (água:acetonitrila, 50:50 v/v).

Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de acetonitrila e ácido fórmico 1,0% (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após, 800 µL do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuscitado com 100 µL de metanol e 100 µL de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

#### 4.7.2 Seletividade

A seletividade foi avaliada através da comparação entre as matrizes. Para tal, seis alíquotas de plasma (quatro normais, um lipêmico e um hemolisado) isentas de sitagliptina e PI, foram comparadas com uma alíquota de plasma normal fortificado com sitagliptina e PI, em concentração correspondente ao limite inferior de quantificação (LIQ).

O preparo das matrizes isentas (quatro normais, um lipêmico e um hemolisado) seguiu o item 4.6.3. Já a amostra de plasma fortificada com LIQ seguiu o preparo do item 4.6.1 com a fortificação da solução de sitagliptina 15 ng/ML.

Os resultados obtidos nos cromatogramas referentes as matrizes isentas de sitagliptina e PI foram comparados ao cromatograma da matriz fortificada na concentração LIQ. A partir disso, foi calculado a diferença entre as respostas dos picos interferentes, presentes na matriz isenta de analito, com a resposta obtida na área do LIQ. Foi considerado satisfatório valores < 20% para sitagliptina e < 5% para o PI (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

#### 4.7.3 Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi calculado através da relação sinal/ruído. Para o estudo, alíquotas de 200 µL de plasma branco, descongeladas à temperatura ambiente, foram fortificadas com 20 µL de PI 1000 ng/mL e 20 µL de solução de trabalho de sitagliptina em concentrações decrescentes.

As amostras fortificadas foram agitadas em vórtex por 1 minuto. Em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de acetonitrila com 1,0% de ácido fórmico (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após, 800 µL do sobrenadante, foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação (centrivap).

O resíduo remanescente foi ressuspendido com 100 µL de metanol e 100 µL de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4°C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto.

Essas amostras foram injetadas no sistema CLAE-EM/EM até atingir o menor nível quantificável com precisão e exatidão (desvio padrão relativo e erro padrão relativo  $\leq 20\%$ ). O LIQ foi determinado de acordo com a menor concentração a produzir uma relação sinal/ruído superior a 5/1 precisa e exata (FDA, 2018).

#### 4.7.4 Curva de Calibração (Linearidade)

Com base no método de padronização interna, a curva de calibração foi construída em triplicata, em três dias consecutivos, incluindo amostras de plasma branco normal (sem analito e PI) e plasma branco zero (sem analito e com PI). Para a construção da curva, seis níveis de concentração da sitagliptina foram preparados através de sucessivas diluições das soluções de trabalho. Na TABELA 4 são apresentadas as concentrações de analito e padrão interno.

TABELA 4 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO CURVA DE CALIBRAÇÃO

Analito	Nível	Concentração (ng/mL)
Sitagliptina	1 (LIQ)	1,5
	2	10
	3	50
	4	100
	5	300
Fluconazol (PI)	6 (LSQ)	500
	-	100

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: LIQ: Limite inferior de quantificação; LSQ: Limite Superior de Quantificação; PI: Padrão interno.

A construção das curvas de calibração teve intuito de verificar a linearidade da relação entre as áreas dos picos do analito pela área do pico do PI *versus* as concentrações dos analitos pela concentração do PI. O método dos mínimos quadrados foi o modelo matemático utilizado na construção da curva, utilizando a regressão linear 1/x. O ângulo, equação da reta, intercepto e coeficiente de correlação também foram calculados.

Para sua aprovação, os níveis da curva devem apresentar desvio  $\leq 20\%$  para a concentração nominal de LIQ e  $\leq 15\%$  para as demais concentrações nominais. A curva só pode ser aprovada se tiver pelo menos 75% dos padrões de calibração dentro dessas especificações e se o índice de correlação for superior a 0,98 (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

O preparo das amostras dos níveis 1 (LIQ), 2, 3, 4, 5 e 6 (LSQ) ocorreu conforme descrito no item 4.6.1 com a fortificação utilizando solução de sitagliptina 15 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 3000 ng/mL e 5000 ng/mL para cada nível, respectivamente. Já as amostras de plasma branco seguiram o item 4.6.3 e as amostras de plasma zero o item 4.6.4.

#### 4.7.5 Precisão e Exatidão

A Precisão e a exatidão foram determinadas em três dias consecutivos, em abordagem intracorrida (calculada com os valores das triplicatas obtidas em cada dia) e intercorrida (calculada com os valores das triplicadas dos três dias). Para tal, três

replicatas de cada controle foram preparadas (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) de acordo com o item 4.6.1.

Para considerar preciso e exato, os valores calculados de coeficiente de variação (EQUAÇÃO 1) e erro padrão relativo (EQUAÇÃO 2) devem ser  $\leq 15\%$ , exceto para o LIQ que pode atingir valores de até 20% (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

EQUAÇÃO 1 - COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão} \times 100}{\text{Concentração Média Experimental}}$$

FONTE: Brasil (2012).

LEGENDA: CV: Coeficiente de variação.

EQUAÇÃO 2 - ERRO PADRÃO RELATIVO

$$EPR = \frac{(\text{Concentração Média Experimental} - \text{Valor Nominal}) \times 100}{\text{Valor Nominal}}$$

FONTE: Brasil (2012).

LEGENDA: EPR: Erro padrão relativo.

#### 4.7.6 Recuperação

No ensaio de recuperação, foram comparadas as amostras fortificadas antes da extração (FA) com as amostras fortificadas após a extração (FD), de modo a verificar a perda de sitagliptina e PI durante o processo de preparo da amostra.

As amostras foram preparadas nas concentrações CQB, CQM e CQA (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), fortificadas com solução de sitagliptina de 50 ng/mL, 2000 ng/mL e 4000 ng/mL para cada controle, respectivamente, de acordo com os itens 4.6.1 e 4.6.2. Para cada concentração foram preparadas cinco replicatas.

A recuperação foi estimada por meio do cálculo diferencial entre os resultados obtidos das amostras FA e FD. Os resultados, levam em consideração os resultados obtidos nas FD como 100% (FDA, 2018).



#### 4.7.7 Efeito Matriz

Para constatar se o efeito matriz é significativo, foi avaliada a diferença entre a concentração da sitagliptina e PI em amostras de plasma FD e em solução. Por isso, foram preparadas amostras de CQB e CQA, seguindo o item 4.6.2, fortificadas com solução de sitagliptina 50 ng/mL e 4000 ng/mL, respectivamente.

As amostras fortificadas foram preparadas em oito replicas, a partir de quatro plasmas branco normal, dois plasmas branco hemolisados e dois plasmas branco lipêmicos. As respostas foram comparadas com as respostas da solução de sitagliptina de 5 ng/mL e 400ng/mL e da solução de PI 100 ng/mL.

Em cada controle de qualidade foi estimado o fator de matriz normalizado (FMN), por padrão interno para as oito replicatas (BRASIL, 2012). As respostas das amostras FD foram comparadas com as respostas das amostras em solução, de acordo com a EQUAÇÃO 3:

#### EQUAÇÃO 3 - FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO

$$FMN = \frac{\text{Resposta do Analito em Matriz} \div \text{Resposta do PI em Matriz}}{\text{Resposta do Analito em Solução} \div \text{Resposta do PI em Solução}}$$

FONTE: Brasil (2012).

LEGENDA: FMN: Fator de matriz normalizado.

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs de todas as amostras deve ser inferior a 15% para que o efeito matriz seja considerado não significativo (BRASIL, 2012).

#### 4.7.8 Efeito Residual

O teste de efeito residual foi realizado através da injeção de uma amostra de plasma branco, seguido da injeção de uma amostra de plasma fortificado na concentração LSQ (TABELA 4) e da injeção de mais duas amostras de plasma branco. As amostras de plasma branco foram preparadas conforme descrito no item 4.6.3 enquanto que a amostra fortificada LIQ seguiu o preparo do item 4.6.1, fortificado com solução de sitagliptina 5000 ng/mL.

Os resultados obtidos nas injeções de plasma branco após a injeção de plasma fortificado LSQ são comparados com os resultados de amostras LIQ. É considerado isento de efeito residual os resultados que apresentam interferentes no tempo de retenção do analito menor que 20% da resposta do LIQ e menor que 5% para a resposta do PI (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

#### 4.7.9 Estabilidade

A estabilidade do analito deve ser demonstrada em matriz biológica e em solução. Já o PI tem sua estabilidade demonstrada apenas em solução (BRASIL, 2012).

##### 4.7.9.1 Estabilidade do analito em plasma

Para cada ensaio de estabilidade em plasma, três replicatas para as concentrações CQB e CQA foram preparadas a partir da fortificação do plasma branco com, respectivamente, 20 µL de solução de sitagliptina 50 ng/mL e 4000 ng/mL, em seguida agitadas em vortex por 1 minuto.

No teste de estabilidade de curta duração, as amostras fortificadas foram mantidas sobre a bancada em temperatura ambiente (25 °C) por 6 horas. Em seguida, foi realizada a extração das amostras, conforme descrito no item 4.6.1, porém sem adicionar solução de sitagliptina.

Para o ensaio de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras fortificadas apenas com a sitagliptina foram congeladas por 12 horas (-40 °C) e descongeladas à temperatura ambiente (25 °C). Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas por mais um período de 12 horas (-40 °C), e assim por diante até completar três ciclos de congelamento e descongelamento. Por fim, as amostras foram submetidas ao processo de extração de acordo com o item 4.6.1, sem a adição de solução de sitagliptina.

Já para a estabilidade pós-processamento, as amostras CQB e CQA foram fortificadas e extraídas de acordo com o item 4.6.1, fortificadas respectivamente com 50 ng/mL e 4000 ng/mL, sem serem injetadas no sistema CLAE-EM/EM. Após o

preparo, as amostras foram mantidas no gerenciador de amostras por 8 horas (5 °C) e posteriormente foram injetadas no sistema CLAE-EM/EM.

Os resultados obtidos após as três condições de estabilidade testadas, foram comparados com os resultados de amostras recém preparadas. As mostras foram consideradas estáveis quando apresentaram resposta com valor nominal  $\leq 15\%$ , com base nas concentrações determinadas através da curva de calibração recém preparada (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

#### 4.7.9.2 Estabilidade do analito e PI em solução

Para as estabilidades em solução, foram preparadas replicatas das soluções de trabalho da sitagliptina nas concentrações de 50 ng/mL, 2000 ng/mL e 4000 ng/mL e na concentração de 1000 ng/mL para o PI. As soluções permaneceram sobre bancada por 6 horas (25 °C) e na geladeira por 72 horas (4°C). Decorrido o período de tempo, as amostras foram diluídas até obter as concentrações CQB, CQM e CQA (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Os resultados obtidos com essas amostras foram comparados com valores obtidos das soluções CQB, CQM e CQA recém preparadas.

As soluções para serem consideradas estáveis, devem apresentar desvios  $\leq 10\%$  em relação as soluções recém preparadas (BRASIL, 2012; FDA, 2018).

## 4.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Para demonstrar a aplicabilidade do método, seis voluntários saudáveis foram convidados a participar de um estudo farmacocinético preliminar. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob número de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 09925519.1.0000.0102 (ANEXO 1), e o consentimento informado por escrito e assinado por todos os voluntários.

Os voluntários foram divididos em dois grupos, ambos receberam dose única de sitagliptina, 50 mg, o primeiro na forma de comprimido comercial (Januvia<sup>®</sup>, Merck

Sharp & Dohme) e o segundo na forma de comprimidos orodispersíveis, desenvolvidos e produzidos segundo Stofella, 2018. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de EDTA nos pontos de tempo zero (antes de tomar o medicamento) e 1, 2, 4, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a administração das diferentes formas farmacêuticas. Os tempos de coleta das amostras foram baseados em estudos farmacocinéticos da sitagliptina realizados por Herman et al. (2005), Bergman et al. (2006), Herman et al. (2006), Bergman et al. (2009), Arun et al. (2011), Herman et al. (2011), Smulders et al (2012), Kim et al. (2013), He et al. (2014) e Sangle et al. (2018).

Após a coleta, os tubos contendo as amostras de sangue foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. Em seguida, o plasma foi separado e aliquoteado (200 µL) em tubos tipo Eppendorf para armazenamento em *freezer* (-40 °C) até o momento da análise.

#### 4.8.1 Preparo de Amostra

As alíquotas de 200 µL de plasma, foram descongeladas à temperatura ambiente. Nelas foram adicionados 20 µL de solução de acetonitrila:água (50:50, v/v) e 20 µL de solução PI, 1000 ng/mL. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 minuto, em seguida foram submetidas ao processo de extração, com a adição de 760 µL de acetonitrila e ácido fórmico 1,0% (v/v) e agitadas em vórtex por 2 minutos.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos e 800 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo de centrifugação e levado a um concentrador de amostras para evaporação.

O resíduo remanescente foi ressuspenso com 100 µL de metanol e 100 µL de acetonitrila, e foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos. Por último, as amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 10 minutos e 180 µL do sobrenadante foi retirado e transferido para um vial com inserto para então ser injetado no sistema CLAE-EM/EM.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE-EM/EM

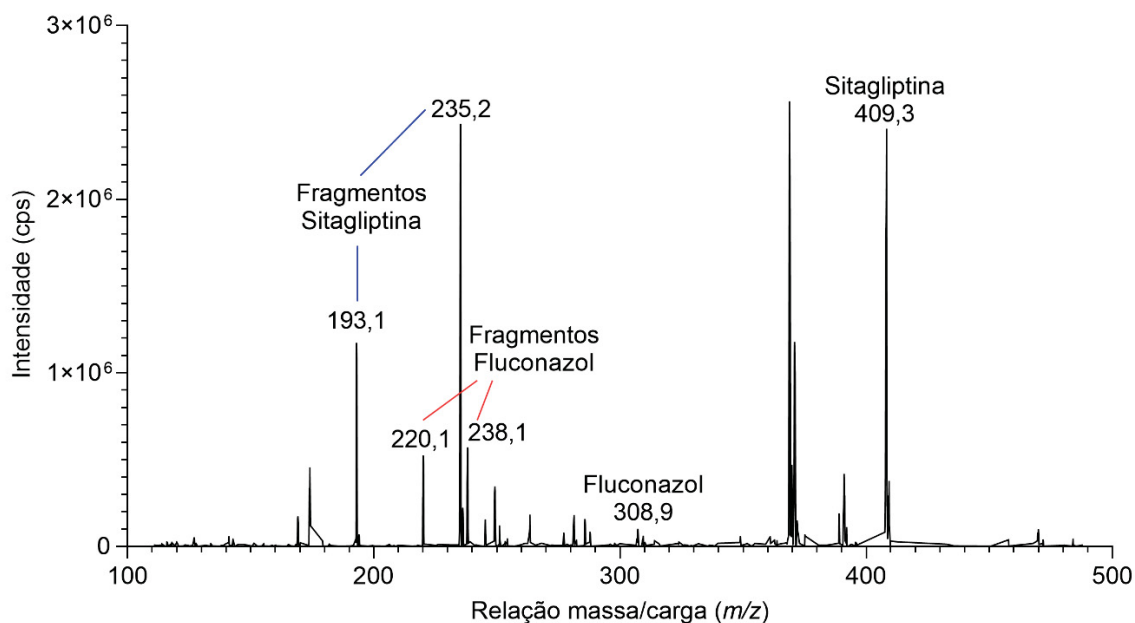
A primeira etapa, no desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, é a otimização dos parâmetros espectrométricos. Inicialmente o espectrômetro de massas não fica acoplado ao cromatógrafo, o que permite variar os parâmetros espectrométricos, a fim de obter maior intensidade de sinal, através da infusão direta de soluções separadas de analito e padrão interno.

Para se iniciar o estudo é necessário escolher o tipo de fonte utilizada no espectrômetro. A fonte escolhida foi a *Electrospray* (ESI), devido suas características de robustez, sensibilidade, alta performance na ionização de compostos e capacidade de trabalhar com matrizes altamente complexas como o plasma.

Logo após a escolha da fonte é necessário realizar a análise de varredura (*full scan*), determinando a concentração do analito, do padrão interno e modo de ionização a fim de obter as intensidades de sinal adequadas. Nessa etapa, soluções de trabalho contendo 100 ng/mL de sitagliptina e fluconazol, foram preparadas e foi realizada a infusão das mesmas, separadamente no espectrômetro de massas.

Os modos de ionização positivo e negativo foram avaliados tanto para a sitagliptina quanto para o fluconazol (PI). No modo de ionização negativo a intensidade de sinal ficou baixa, o que não possibilitou o seu uso. Já a ionização no modo positivo gerou o espectro de massas mostrado na FIGURA 4.

FIGURA 4 - ESPECTRO DE MASSAS OBTIDO PARA OS PADRÕES ANALÍTICOS SITAGLIPTINA E FLUCONAZOL



FONTE: O Autor (2020).

NOTA: Diluente: acetonitrila:água 50:50 (v/v) contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Intensidades referentes a solução com concentração de 100 ng/mL para sitagliptina e fluconazol.

Assim que visualizado os sinais, alguns ajustes na concentração das soluções foram realizados, a fim de se obter intensidades de sinais entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps, intensidade esta recomendada pelo fabricante do equipamento para otimização automática dos parâmetros individuais dos compostos via Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Em seguida foram testados diferentes aditivos na fase móvel (ácido fórmico e formiato de amônio, isolado e combinado) visando aumentar a intensidade de sinal. O ácido fórmico demonstrou ser mais indicado, enquanto a combinação dos aditivos ou formiato de amônio isolado apresentaram desempenhos inferiores.

Com o aditivo escolhido, diferentes concentrações dele foram testadas (entre 0,1 e 0,5%, v/v), porém não houve diferença significativa entre as concentrações, por isso optou-se por utilizar o aditivo em menor concentração, de 0,1% (v/v).

Alcançada a faixa de intensidade desejada e após a seleção do aditivo, foi possível realizar a otimização automática dos parâmetros individuais dos compostos por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM).

Ao término das otimizações por MRM, foram obtidos dois fragmentos de íons mais intensos de cada padrão. O fragmento de maior intensidade, de sitagliptina e PI,

foi utilizado como parâmetro de quantificação, enquanto o outro como parâmetro de qualificação.

Para a sitagliptina, o íon com maior intensidade de sinal foi o  $m/z$  235,2 utilizado para quantificação, enquanto o íon  $m/z$  193,2 foi utilizado apenas para monitoramento. O íon do fluconazol com maior intensidade de sinal foi o  $m/z$  238,1, escolhido para quantificação. O segundo íon, usado apenas para monitoramento foi o  $m/z$  220,2.

Em seguida, realizou-se os ajustes dos parâmetros da fonte de ionização por meio da injeção em fluxo (FIA), ou seja, o acoplamento do CLAE ao EM, sem o uso de coluna cromatográfica. Neste experimento foi estabelecido os parâmetros para sitagliptina e fluconazol: CUR 18 psi, CAD 8 psi, IS 5500 V, temperatura da fonte de 600 °C, GS1 40 psi e GS2 45 psi.

Ao término da otimização dos parâmetros espectrométricos, o método cromatográfico foi desenvolvido. Os parâmetros cromatográficos testados foram baseados nos trabalhos de Zeng et al. (2006), Nirogi et al. (2007), El-Bagary; Elkady; Ayoub (2011), Dubala et al. (2012), Bonde et al. (2013), Burugula et al. (2013), Patel et al. (2014) e Iqbal et al. (2018).

A escolha da fase móvel levou em consideração diferentes composições e eluições, combinando água e acetonitrila (ambas com aditivo de AFO 0,1% v/v) em modo isocrático e gradiente (com variações de 50 a 90%), com fluxo mantido em 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Também foram testados diferentes volumes de injeção (de 3 a 20  $\mu\text{L}$ ) e temperatura de forno (de 20 a 50 °C).

Os picos cromatográficos formados em diferentes condições de eluição isocrática se mostraram assimétricos, sendo considerado inadequados, enquanto que a eluição em modo gradiente possibilitou a simetria dos picos, além de ser o mais adequado devido à complexidade da amostra biológica. A fase móvel ficou assim estabelecida: (A) água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), tempo 0 - 0,50 min: 10% a 50% B; tempo 0,50 - 2,00 min: 50% B; tempo 2,00 - 2,01 min: 50% - 10% B; tempo 2,01 - 5,00 min: 10% B; com fluxo da fase móvel: 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;

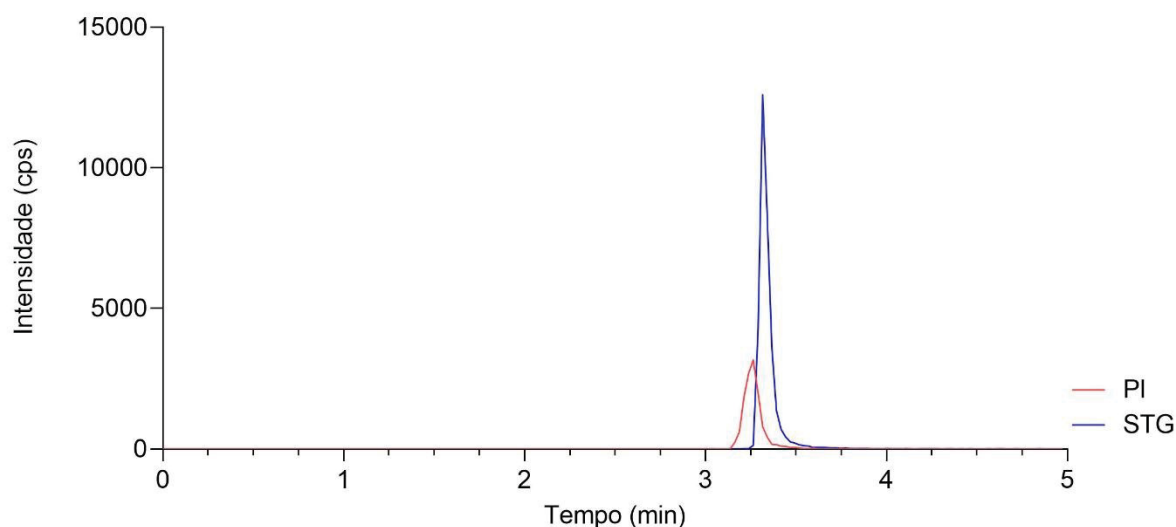
Para garantir que a sitagliptina e o PI não fossem detectados no volume morto da corrida, assim como realizá-la no menor tempo possível (com exatidão e precisão), o fluxo de fase móvel foi testado também em relação a sua vazão. Com variações entre 200 a 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a condição mais favorável foi a de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Já o volume

de injeção foi testado entre 3 e 20  $\mu\text{L}$ , sendo que a injeção de 20  $\mu\text{L}$  garantiu picos de maior intensidade de sinal. A temperatura da coluna testada entre 25 e 40°C, sendo escolhida a temperatura de 35 °C por apresentar melhores resultados (picos mais simétricos e com melhor resolução).

Portanto, o método desenvolvido foi capaz de analisar a sitagliptina de forma rápida, com sensibilidade e resolução de pico, tanto para a sitagliptina quanto para o padrão interno. A elevada seletividade da ferramenta analítica, aliada a um eficiente gradiente de eluição, possibilita a análise ser extremamente eficiente e rápida, com um tempo total de cinco minutos. Além de ser considerado um método com baixa produção de resíduos, uma vez que o fluxo de fase móvel é baixo e a corrida é curta.

O cromatograma obtido para a condição final estabelecida para a fase móvel pode ser observado na FIGURA 5.

FIGURA 5 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A AMOSTRA DE PLASMA FORTIFICADO COM 125 ng/mL DE SITAGLIPTINA E 100 ng/mL DE PADRÃO INTERNO



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: PI: Padrão Interno; STG: Sitagliptina.

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ . Fluxo: 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35 °C.

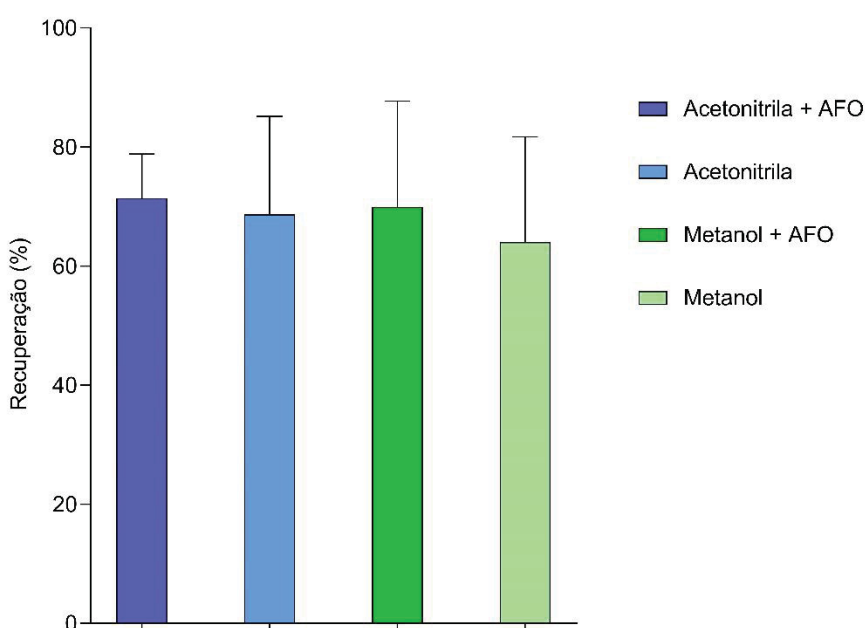


## 5.2 TESTES CONDUZIDOS PARA AVALIAR A MELHOR FORMA DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO PLASMA BRANCO FORTIFICADO

A extração por precipitação de proteínas foi escolhida por ser utilizada em diversos estudos com a sitagliptina, como El-Bagary; Elkady; Ayoub (2011), Dubala et al. (2012), Bonde et al. (2013), Burugula et al. (2013), Patel et al. (2014) e Reddy et al. (2015), bem como por ser um método rápido, simples, de baixo custo e aplicável em compostos hidrofílicos como a sitagliptina. Outras técnicas como extração em fase sólida e líquido-líquido não seriam viáveis para a extração da sitagliptina e do PI, devido as características de polaridade dos analitos e, como objetivo do trabalho envolve o estudo farmacocinético, demandaria elevado custo de solventes e colunas.

Foram testados metanol, metanol com 1,0% (v/v) de ácido fórmico, acetonitrila e acetonitrila com 1,0% (v/v) de ácido fórmico como agentes precipitantes. Na FIGURA 6 pode-se observar a comparação entre os quatro agentes precipitantes testados. A acetonitrila com 1% (v/v) de ácido fórmico foi escolhida por apresentar maior recuperação e menor coeficiente de variação (<15%), demonstrado pela barra de erro.

FIGURA 6 - RECUPERAÇÃO DA SITAGLIPTINA EM PLASMA HUMANO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO DIFERENTES AGENTES PRECIPITANTES



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: AFO: Ácido Fórmico 1,0% (v/v).

## 5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO

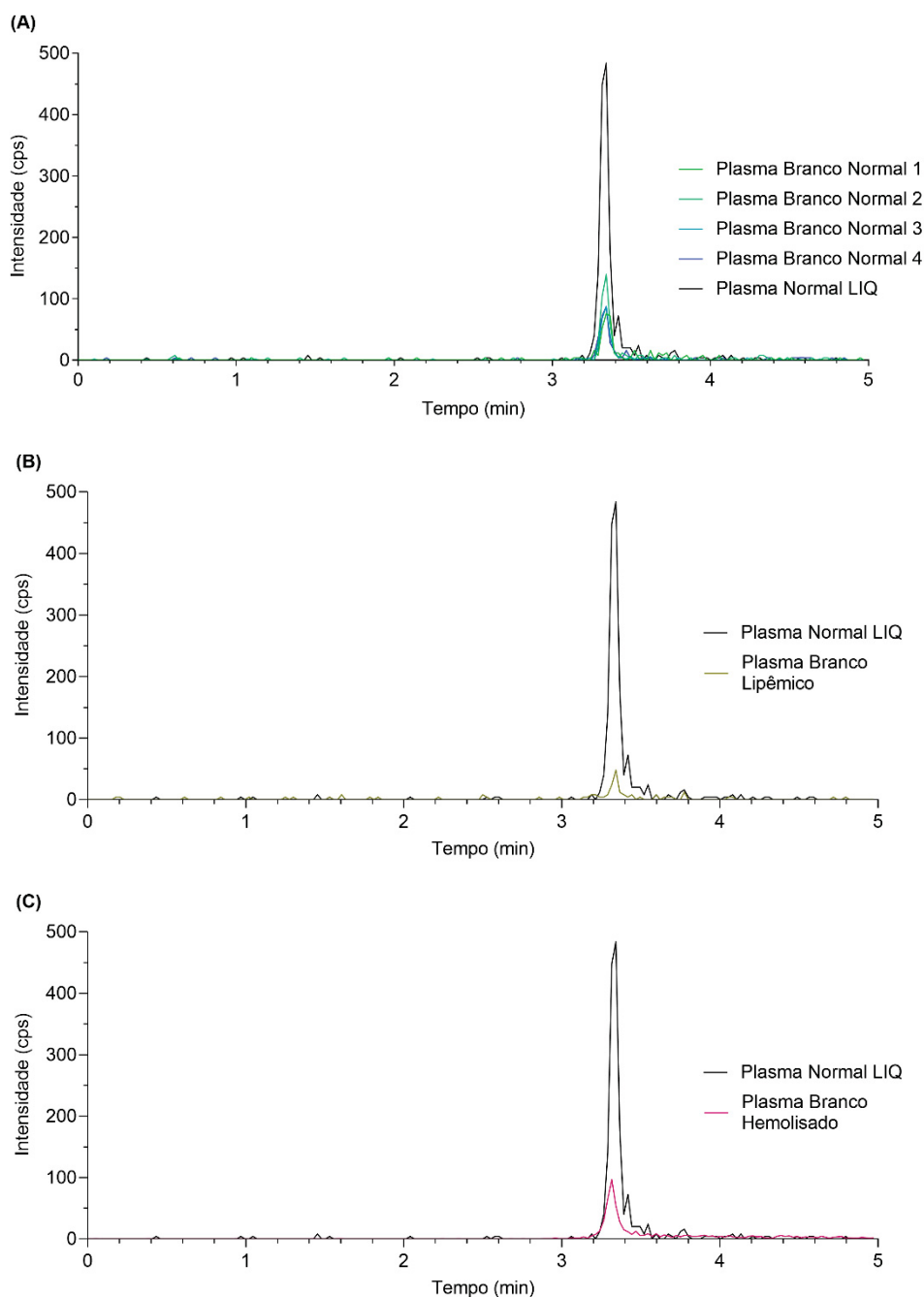
### 5.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada em plasma humano normal, lipêmico e hemolisado. Na

FIGURA 7 e na

são apresentados os cromatogramas obtidos para o plasma branco e LIQ, próximos aos tempos de retenção do analito e do padrão interno, respectivamente. Apesar da presença de picos nas áreas de retenção da sitagliptina, eles são inferiores a 20%. Além disso, para o padrão interno os interferentes apresentaram áreas inferiores a 5%. É possível então, afirmar que o método é seletivo para a análise da sitagliptina, pois as áreas dos interferentes são menores que o preconizado nos guias.

FIGURA 7 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA NORMAL, HEMOLISADO, LIPÊMICO E LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO DA SITAGLIPTINA

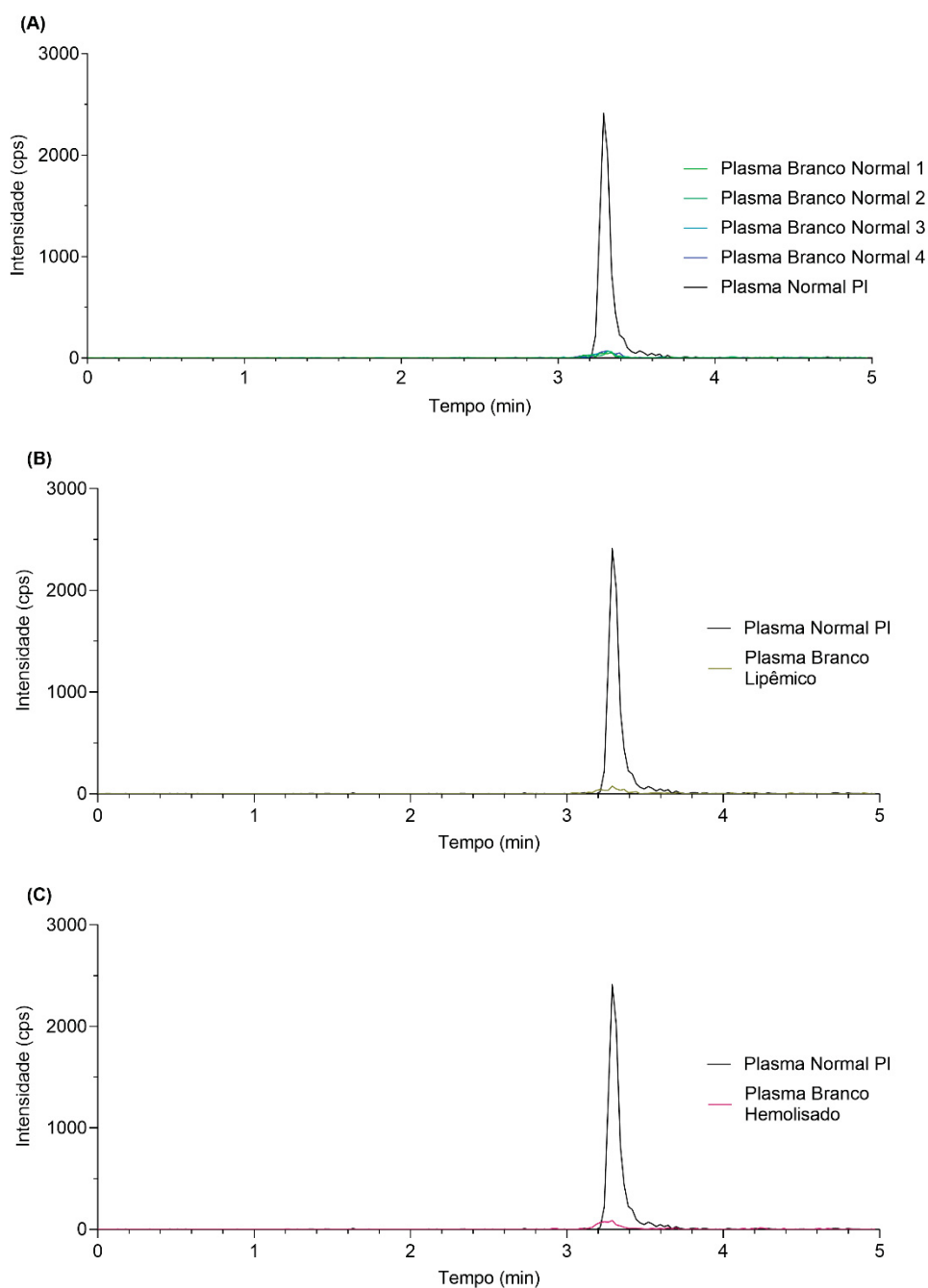


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: LIQ: Limite Inferior de Quantificação (1,5 ng/mL). Figura (A): Sobreposições dos cromatogramas obtidos de quatro amostras de plasma branco normal e uma amostra de plasma normal LIQ. Figura (B): Sobreposições dos cromatogramas obtidos de uma amostra de plasma branco lipêmico e uma amostra de plasma normal LIQ. Figura (C): Sobreposições dos cromatogramas obtidos de uma amostra de plasma branco hemolisado e uma amostra de plasma normal LIQ.

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu$ m). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m). Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fluxo: 300  $\mu$ L/min. Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35  $^{\circ}$ C. Transição quantificada da sitagliptina m/z 235.

FIGURA 8 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS DE AMOSTRAS DE PLASMA NORMAL, HEMOLISADO, LIPÊMICO E PADRÃO INTERNO



FONTE: O Autor (2020).

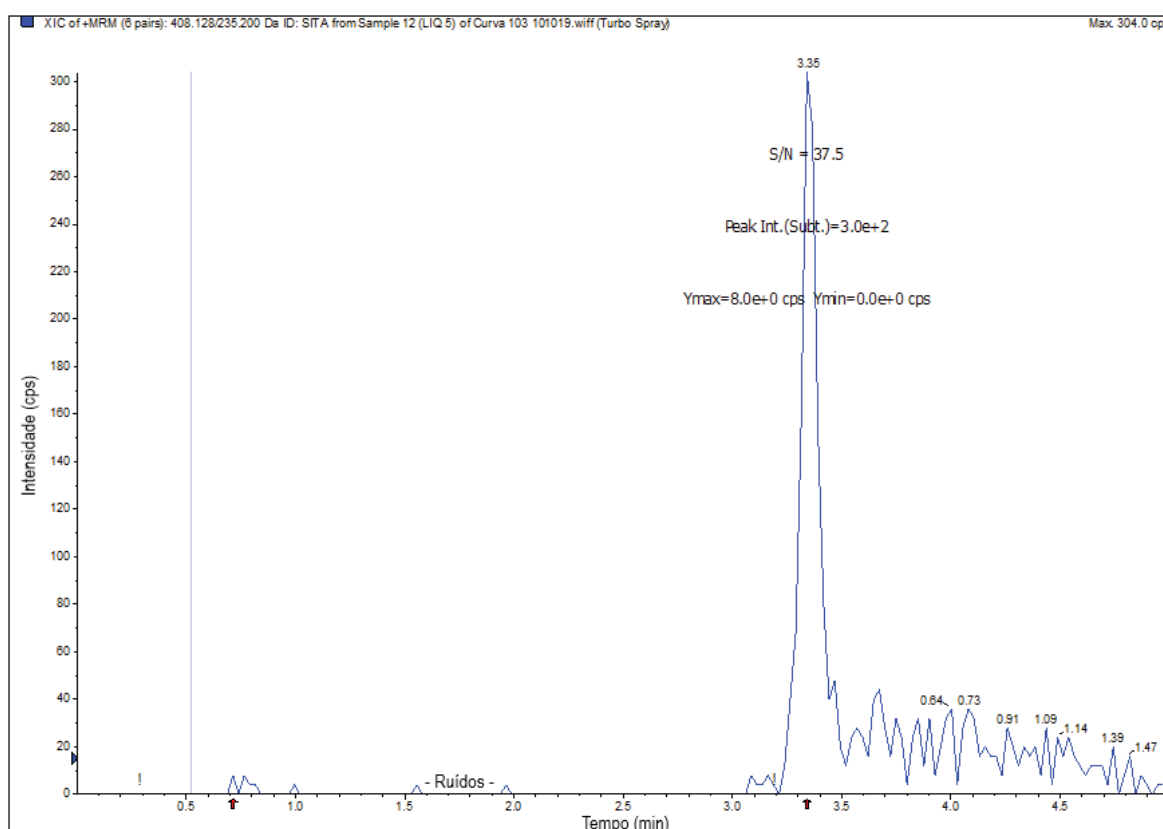
LEGENDA: PI: Padrão interno, fluconazol 100 ng/mL. Figura (A): Sobreposições dos cromatogramas obtidos de quatro amostras de plasma branco normal e uma amostra de plasma normal PI. Figura (B): Sobreposições dos cromatogramas obtidos de uma amostra de plasma branco lipêmico e uma amostra de plasma normal PI. Figura (C): Sobreposições dos cromatogramas obtidos de uma amostra de plasma branco hemolisado e uma amostra de plasma normal PI.

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 μm). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5 μm). Volume de injeção: 20 μL. Fluxo: 300 μL/min. Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35 °C. Transição quantificada do fluconazol m/z 238.

### 5.3.2 Limite Inferior de Quantificação

A alta sensibilidade do método desenvolvido é demonstrada através do baixo LIQ (relação sinal/ruído  $\geq 5$ ), de 0,5 ng/mL, que pode ser observado na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Contudo, este não foi considerado o primeiro ponto da curva. Foi considerado como LIQ da curva a concentração de 1,5 ng/mL, visto que ao analisar a curva de calibração, a concentração de 0,5 ng/mL comprometeu a linearidade, mesmo sendo preciso e exato. Assim, o valor de 1,5 ng/mL é satisfatório para a aplicabilidade pretendida do método (estudos de monitoramento terapêutico, farmacocinética e bioequivalência farmacêutica).

FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DA TRANSIÇÃO 235 DA SITAGLIPTINA OBTIDO DE AMOSTRA DE PLASMA BRANCO FORTIFICADO NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 0,5 NG/ML



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: S/N: Relação sinal/ruído.

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu$ m). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m). Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fluxo: 300  $\mu$ L/min. Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35 °C.

### 5.3.3 Curva de Calibração

O intervalo da curva de calibração foi estabelecido de acordo com a aplicabilidade do método, estimado através de estudos farmacocinéticos semelhantes como Herman et al. (2005), Bergman et al. (2006), Herman et al. (2006), Bergman et al. (2009), Arun et al. (2011), Herman et al. (2011), Smulders et al (2012), Kim et al. (2013), He et al. (2014) e Sangle et al. (2018).

A relação linear entre a área do pico da sitagliptina dividida pela área do pico do PI *versus* a relação da concentração de sitagliptina sobre a concentração de PI foi confirmada através da curva de calibração. Após três dias de ensaios, as curvas de calibração foram aprovadas por apresentarem no mínimo 75% dos padrões de calibração precisos e exatos. Para serem aprovados os padrões com nível de concentração 2, 3, 4, 5 e LSQ apresentaram desvio padrão e erro padrão relativo inferiores a 15%, e o padrão LIQ apresentar desvio padrão e erro padrão relativo menor que 20%.

Na



TABELA 5 estão os valores de precisão das amostras em triplicata e exatidão de cada replicata. É importante destacar que as curvas apresentaram índice de correlação ( $r$ ) superior a 0,99 conforme demonstrado na FIGURA 10 (referente ao 1º dia), FIGURA 11 (referente ao 2º dia) e FIGURA 12 (referente ao 3º dia).

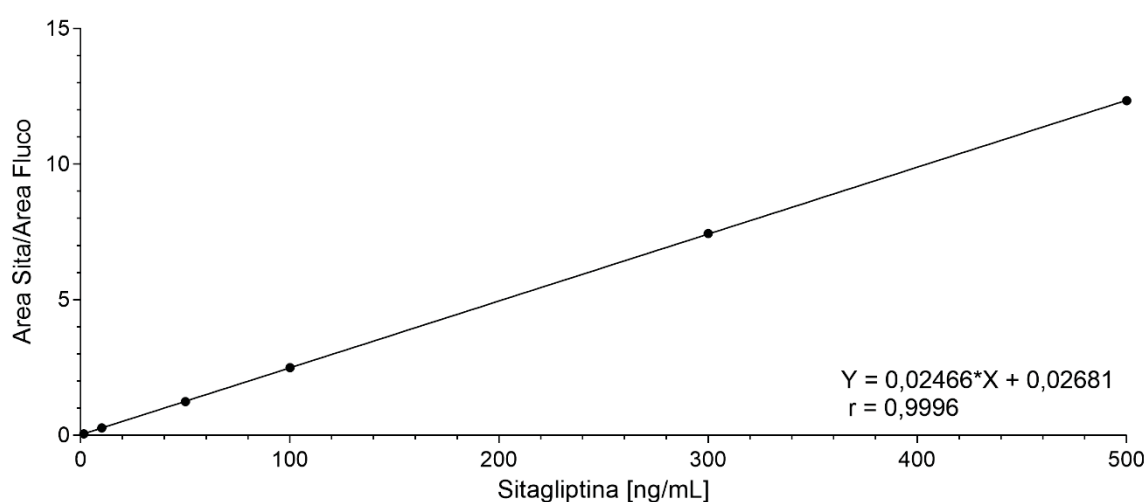
TABELA 5 - VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA

Concentração nominal (ng/mL)	1º Dia (n=3)		2º Dia (n=3)		3º Dia (n=3)	
	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)
1,5	12,4	16,0	5,7	-18,6	18,6	-13,7
		6,0		-9,8		-9,8
		-14,7		-19		1,0
10	5,7	11,0	8,5	3,0	6,7	15
		1,0		15,0		2,0
		-2,5		6,0		1,0
50	11,0	15,0	0,33	2,0	3,4	15
		-7,3		2,0		15
		-7,9		2,0		7,0
100	4,4	-0,3	6,6	-8,8	5,5	-3,4
		7,0		7,0		6,0
		-3,7		-3,3		7,0
300	0,94	1,0	1,8	6,0	4,0	-4,5
		2,0		4,0		3,0
		1,0		9,0		5,0
500	1,8	-1,6	8,2	-10,5	2,8	-6,0
		1,0		-11,3		1,0
		3,0		-5,2		-2,7

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: CV%: Coeficiente de Variação; EPR%: Erro Padrão Relativo.

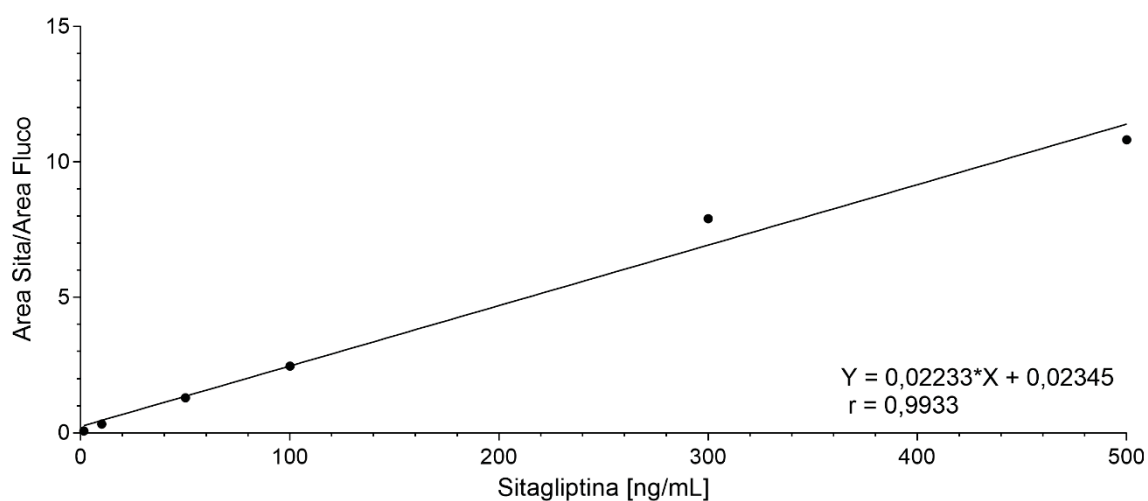
FIGURA 10 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA OBTIDA PELA TRIPLICATA DE CADA CONCENTRAÇÃO NO 1º DIA



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: r: índice de correlação.

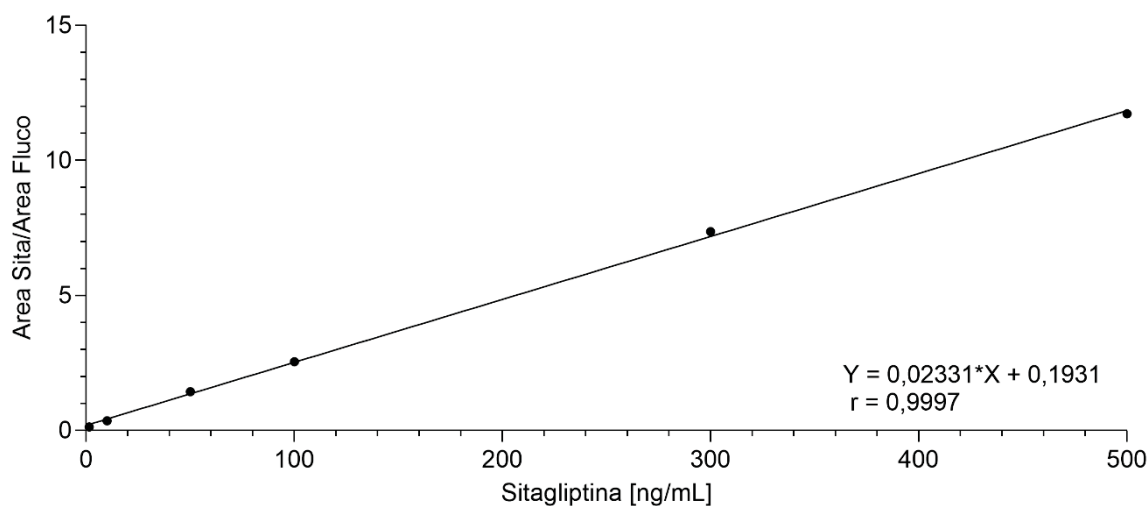
FIGURA 11 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA OBTIDA PELA TRIPLICATA DE CADA CONCENTRAÇÃO NO 2º DIA



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: r: índice de correlação.

FIGURA 12 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SITAGLIPTINA OBTIDA PELA TRIPLICATA DE CADA CONCENTRAÇÃO NO 3º DIA



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: r: índice de correlação.

### 5.3.4 Precisão e Exatidão

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados através de cinco replicatas das concentrações de controle de qualidade: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD.

O método pode ser considerado preciso e exato pois apresenta valores de CV e EPR inferiores a 20% para LIQ, e inferiores a 15% para os demais controles de qualidade, tanto para o ensaio intracorrída quanto para intercorrída. Os resultados podem ser observados na TABELA 6.

TABELA 6 - RESULTADOS DE PRECISÃO E EXATIDÃO

Amostra	Concentração Nominal (ng/mL)	1º Dia (n=5)			2º Dia (n=5)			3º Dia (n=5)			Intercorrida (n=15)		
		Concentração Calculada (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)	Concentração Calculada (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)	Concentração Calculada (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)	Concentração Calculada (ng/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR%)
LIQ	1,5	1,52	12,4	2,4	1,6	5,7	10,1	1,2	18,6	-19,9	1,4	12,2	-2,5
CQB	5,0	4,7	11,0	-5,8	5,6	13,2	13,2	4,3	14,7	-14,3	4,8	12,9	-2,3
CQM	200	229,8	14,7	14,9	227,2	12,3	13,6	182,2	12,4	-8,9	213,0	13,1	6,5
CQA	400	458,8	5,9	14,7	436,4	7,9	9,1	447,2	11,6	11,8	447,2	8,4	11,8
CQD	200	198,8	2,9	-0,6	188,4	2,1	-5,8	175,2	2,5	-12,4	187,4	9,3	-6,3

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: CV: coeficiente de variação; EPR: Erro Padrão Relativo; LIQ: amostra do limite inferior de quantificação; CQB: Amostra de Controle de Qualidade de Baixa Concentração; CQA: Amostra de Controle de Qualidade de Alta Concentração; CQD: Amostra de Controle de Qualidade de Diluição.

### 5.3.5 Recuperação

Os resultados da recuperação do analito e do padrão interno utilizando o método de extração por precipitação de proteínas com acetonitrila e ácido fórmico 1% (v/v) podem ser observados na TABELA 7. Obteve-se uma recuperação satisfatória (96,92 – 98,19%), a qual foi alcançada com alta repetibilidade (CV<10%).

TABELA 7 – RECUPERAÇÃO DA SITAGLIPTINA E DO FLUCONAZOL OBTIDOS COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA E ÁCIDO FÓRMICO 1,0% (v/v)

Amostra (n = 3)	Concentração nominal (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
CQB	5,0	98,12	6,00
CQM	200	96,92	1,90
CQA	400	98,19	5,61
PI	100	93,23	7,56

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: CQB: Amostra de Controle de Qualidade de Baixa Concentração; CQM: Amostra de Controle de Qualidade de Média Concentração; CQA: Amostra de Controle de Qualidade de Alta Concentração; PI: Padrão Interno; CV: Coeficiente de Variação.

### 5.3.6 Efeito Matriz

Após os cálculos dos fatores de matriz normalizado com os três tipos de plasma (normal, lipêmico e hemolisado), por meio da comparação das áreas dos analitos obtidas nas amostras FD com às áreas do analito em solução, nas mesmas concentrações, foi possível comprovar que o método não apresenta efeito matriz que comprometa a análise, visto que os valores de CV% dos FMN foram inferiores a 15%. Os resultados do ensaio de efeito matriz encontram-se na TABELA 8 e indicam que o efeito da matriz biológica na resposta dos analitos e PI é insignificante, pois as variações (CV%) obtidas para os fatores de matriz normalizados (FMN) é inferior a 15%.

TABELA 8 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EFEITO MATRIZ

Analito	Amostra (n = 3)	Concentração Nominal	Média dos FMN $\pm$ DP	CV (%)
Sitagliptina	CQB	5,0 ng/mL	0,973 $\pm$ 0,093	9,50
	CQA	400 ng/mL	0,698 $\pm$ 0,021	2,98

FONTE: O Autor (2020).

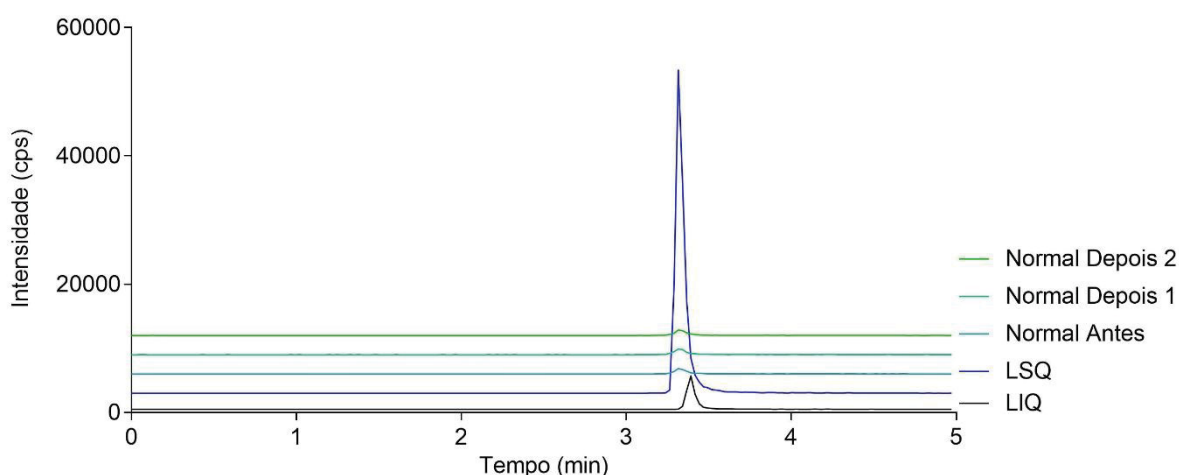
LEGENDA: FMN: Fator de Matriz Normalizado; DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente De Variação; CQB: Controle de Qualidade de Baixa Concentração; CQA: Controle de Qualidade de Alta Concentração.

NOTA: O FMN foi calculado utilizando os três tipos de plasma (normal, lipêmico e hemolisado).

### 5.3.7 Efeito Residual

O resultado do efeito residual está apresentado na FIGURA 13 e na FIGURA 14, onde é possível observar que a resposta dos picos interferentes próximos ao tempo de retenção da sitagliptina e do PI foram inferiores a 20% e 5%, respectivamente, em relação a resposta dos picos na amostra processada do LIQ. Esse resultado demonstra a ausência de contaminantes tanto para a sitagliptina quanto para o PI.

FIGURA 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DA SITAGLIPTINA

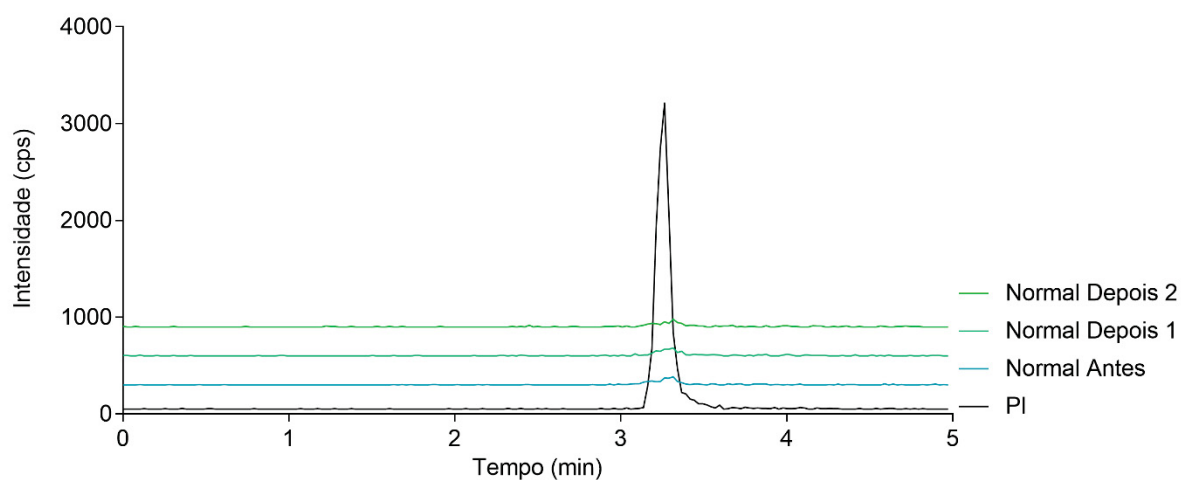


FONTE: O Autor (2020)

LEGENDA: LSQ: Limite Superior de Quantificação, 500ng/mL; LIQ: Limite Inferior de Quantificação, 2,5 ng/mL. Normal Antes: amostra injetada anteriormente a amostra LSQ; Normal Depois 1 e 2: amostras injetadas em seguida da análise da amostra LSQ.

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu$ m). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m). Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fluxo: 300  $\mu$ L/min. Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35  $^{\circ}$ C. Transição quantificada da sitagliptina  $m/z$  235.

FIGURA 14 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO RESIDUAL DO FLUCONAZOL



FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: PI: Padrão interno, fluconazol 100 ng/mL . Normal Antes: amostra injetada anteriormente a amostra PI; Normal Depois 1 e 2: amostras injetadas em seguida da análise da amostra PI.

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu$ m). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5  $\mu$ m). Volume de injeção: 20  $\mu$ L. Fluxo: 300  $\mu$ L/min. Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35 °C. Transição quantificada do fluconazol *m/z* 238.

### 5.3.8 Estabilidade

Os valores obtidos nos experimentos de estabilidade estão apresentados na



TABELA 9. A avaliação da estabilidade da sitagliptina em plasma mostra que este analito é estável até um período de 6 horas na bancada (25 °C), até 8 horas no gerenciador de amostras (5 °C) e após três ciclos de congelamento e descongelamento pois os erros de precisão (CV%) e exatidão (EPR%) foram menores do que 15%, indicando que não houve diferenças significativas nas respostas após o manuseio e armazenamento das amostras.

TABELA 9 - ESTABILIDADE DA SITAGLIPTINA EM PLASMA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Analito	Estabilidade	Controle de Qualidade (n = 3)	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Calculada (ng/mL)	CV (%)	EPR (%)
Sitagliptina	Pós 3 Ciclos	CQB	5	5,3	1,3	6,1
		CQA	400	433,6	2,1	8,4
	Pós Processamento Curta Duração	CQB	5	5,1	0,1	2,7
		CQA	400	405,6	0,1	1,4
		CQB	5	5,4	1,8	8,1
		CQA	400	439,6	3,6	9,9

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: CQB: Controle de Qualidade de Baixa Concentração; CQA: Controle de Qualidade de Alta Concentração; CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo.

NOTA: Pós 3 Ciclos: Avaliação da sitagliptina após três ciclos de congelamento (-40 °C) e descongelamento (25 °C). Pós processamento: Avaliação da sitagliptina após 8 horas mantida no gerenciador de amostras (5 °C). Curta Duração: Avaliação da sitagliptina após 6 horas mantida em temperatura ambiente (25 °C).

Já a avaliação dos padrões em solução demonstram estabilidade das soluções de trabalho de sitagliptina em 200 e 400 ng/mL e de PI 100 ng/mL por 6 horas a 25 °C e por 72 horas a 4 °C, como observado na TABELA 10.

TABELA 10 - ESTABILIDADE DA SITAGLIPTINA E DO FLUCONAZOL EM SOLUÇÃO DE ÁGUA:ACETONITRILA (50:50, v/v), NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Condição do Estudo (n = 3)	Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração determinada (ng/mL)	CV (%)	EPR (%)
6 h (25 °C)	Sitagliptina	5	5,2	1,1	4,0
		200	204,6	2,9	2,3
	Fluconazol	400	410,3	2,7	2,6
		100	-	1,6	2,4
72 h (4 °C)	Sitagliptina	5	5,1	0,6	1,9
		200	205,2	2,5	2,6
	Fluconazol	400	403,5	0,6	0,9
		100	-	2,3	1,7

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: CV: Coeficiente de Variação; EPR: Erro Padrão Relativo.

#### 5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO BIOANALÍTICO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIOS

O método desenvolvido e validado foi utilizado na quantificação da sitagliptina em amostra de voluntários que receberam dose única de 50 mg deste fármaco. Os voluntários foram divididos em dois grupos: o primeiro recebeu esta dose por meio

de comprimidos de Januvia®, enquanto o segundo grupo recebeu a mesma dose por meio de comprimido orodispersível.

Foi possível observar concentrações plasmáticas de sitagliptina nas amostras dos voluntários compreendidas entre 6,65 a 214,26 ng/mL, acima do LIQ e inferiores ao LSQ (TABELA 11). O perfil farmacocinético comparativo entre as formas farmacêuticas pode ser observado na FIGURA 15.

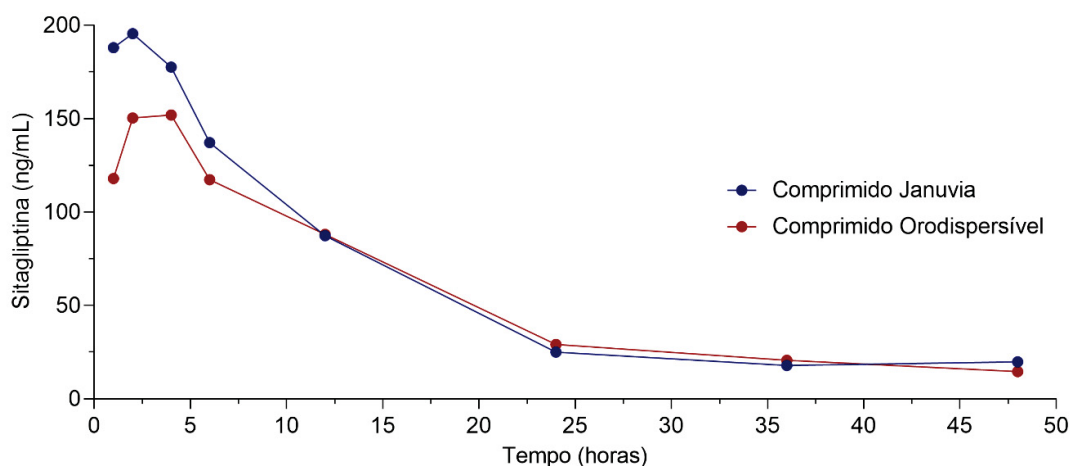
TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE SITAGLIPTINA NAS AMOSTRAS DOS VOLUNTÁRIOS SUBMETIDOS AO ESTUDO FARMACOCINÉTICO

Voluntário	Sexo	Idade (anos)	Tipo de Comprimido	Concentração plasmática máxima (ng/mL)	Concentração plasmática mínima (ng/mL)
1	M	26	JAN	189,09	27,38
2	F	25	COD	162,09	6,65
3	F	40	COD	168,81	14,65
4	F	23	JAN	209,80	8,48
5	M	30	COD	181,20	23,46
6	M	24	JAN	214,26	24,73

FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: M: Sexo Masculino; F: Sexo Feminino; COD: Comprimido Orodispersível; JAN: Comprimido Januvia®.

FIGURA 15 – PERFIL FARMACOCINÉTICO PARCIAL DAS AMOSTRAS DE VOLUNTÁRIO OBTIDA POR CLAE-EM/EM



FONTE: O Autor (2020).

NOTA: Condições cromatográficas: Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 µm). Pré-Coluna: Waters Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 x 12,5 mm, 5 µm). Volume de injeção: 20 µL. Fluxo: 300 µL/min. Eluição: gradiente (acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, v/v, e água com ácido fórmico 0,1%, v/v). Temperatura da coluna: 35 °C. Transição quantificada da sitagliptina *m/z* 235.

Nos dois grupos, a concentração plasmática atingiu os maiores níveis perto de 2 horas após a ingestão, semelhante ao tempo descrito na bula do Januvia®. Esses

resultados sugerem que método desenvolvido é capaz de diferenciar a biodisponibilidade dos comprimidos orodispersíveis, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, e do Januvia®.

Porém, é necessário a realização de um estudo com maior número de voluntários e pontos de coleta, para atingir resultados estatísticos significativos, permitindo determinar e comparar todos os parâmetros farmacocinéticos (como meia vida de eliminação e área sob a curva) entre as duas formas farmacêuticas.

## 6 CONCLUSÃO

A precipitação de proteínas plasmáticas por acetonitrila com ácido fórmico 1% (v/v) proporcionou recuperação reprodutível e satisfatória para a sitagliptina e PI, além de ser um método simples e rápido.

O método por CLAE-EM/EM desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser adequado para a quantificação de sitagliptina em plasma humano. O método desenvolvido foi considerado rápido (curto tempo de corrida) e com baixo consumo de solvente orgânico.

Os parâmetros de validação demonstraram que o método é sensível, seletivo para sitagliptina em plasma normal, lipêmico e hemolisado, linear, na faixa entre 1,5 e 500 ng/mL, preciso, exato, isento de efeito residual e de efeito matriz. Além disso, o analito se apresentou estável em todas as condições testadas, tanto em matriz quanto em solução.

Por fim, o método por CLAE-EM/EM foi aplicado para análise de amostras plasmáticas de voluntários e foi capaz de diferenciar os perfis farmacocinéticos de duas formas farmacêuticas distintas. Diante dos resultados obtidos, é possível utilizar o método como ferramenta na quantificação da sitagliptina, sendo aplicável em diferentes estudos, como os de farmacocinética.

## REFERÊNCIAS

- ALSALIM, W.; GÖRANSSON, O.; CARR, R. D.; BIZZOTTO, R.; TURA, A.; PACINI, G.; MARI, A.; AHRÉN, B. Effect of single-dose DPP-4 inhibitor sitagliptin on  $\beta$ -cell function and incretin hormone secretion after meal ingestion in healthy volunteers and drug-naïve, well-controlled type 2 diabetes subjects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Derby, v. 20, n. 4, p. 1080-1085, abr. 2018.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 34, n. 1, p. S62-S69, jan. 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. S1-S2, jan. 2015.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validations and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**. v. 877, p. 2224-2234. 2009.
- ARIZA, M. G.; VIMALANANDA, V. G.; ROSENZWEIG J. L. The economic consequences of diabetes and cardiovascular disease in the United States. Springer Science+Business Media. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**. v. 11, p. 1-10, fev. 2010.
- ARUN, K. P.; MEDA, V. S.; RAJ KUCHERLAPATI, V. S. P.; DUBALA, A.; DEEPALAKSHMI, M.; VIJAYAKUMAR, A. P. R.; ELANGO, K.; SURESH, B. Pharmacokinetic drug interaction between gemfibrozil and sitagliptin in healthy Indian male volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, p. 709–714. 2012.
- BECONI, M. G.; REED, J. R.; TEFFERA, Y.; XIA, Y. Q.; KOCHANSKY, C. J.; LIU, D. Q.; XU, S.; ELMORE, C. S.; CICCOTTO, S.; HORA, D. F.; STEARNS, R. A.; VINCENT, S. H. Disposition of the Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Sitagliptin in Rats and Dogs. **Drug Metabolism and Disposition**. v.35, p. 525-532. 2007.
- BERGER, J. P.; SINHARROY, R.; POCAL, A.; KELLY, T. M.; SCAPIN, G.; GAO, Y. D.; PRYOR, K. A. D.; WU, J. K.; EIRMAN, G. J.; XU, S. S.; ZHANG, X.; TATOSIAN, D. A.; WEBER, A. E.; THORNBERRY, N. A.; CARR, R. D. A comparative study of the binding properties, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity and glucose-lowering efficacy of the DPP-4 inhibitors alogliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin and vildagliptin in mice. **Endocrinology, Diabetes & Metabolism**. v. 1, p. 1-8, jan. 2018.
- BERGMAN, A. J.; COTE, J.; MAES, A.; ZHAO, J. J.; ROADCAP, B. A.; SUN, L.; VALESKY, R. J.; YANG, A.; KEYMEULEN, B.; MATHIJS, Z.; SMET, M.; LAETHEM, T.; DAVIES, M. J.; WAGNER, J. A.; HERMAN, G. A. Effect of Sitagliptin on the Pharmacokinetics of Simvastatin. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 49, p. 483-488. 2009.
- BERGMAN, A. J.; STEVENS, C.; ZHOU, Y.; YI, B.; LAETHERM, M.; SMET, M. D.; SNYDER, K.; HILLIARD, D.; TANAKA, W.; ZENG, W.; TANEN, M.; WANG, A. Q.;

CHEN, L.; WINCHELL, G.; DAVIES, M. J.; RAMAEL, S.; WAGNER, J. A.; HERMAN, G. A. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Multiple Oral Doses of Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study in Healthy Male Volunteers. **Clinical Therapeutics**. v.28, p. 55-72. 2006.

BLONDE, L. Current Antihyperglycemic Treatment Guidelines and Algorithms for Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **The American Journal of Medicine**. v. 123, p. 12-18, mar. 2010.

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 Sciences**, v. 5, n. 3, p. 463-470. 2013.

BÖSENBERG, L. H.; VAN ZYL, D. G. The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. **Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa**. v. 13, p. 80-88, dez. 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manual de boas práticas em biodisponibilidade**: bioequivalência. ANVISA: Brasília, v.1, 2002.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº N° 1170 de 19 de abril de 2006. Determina a publicação do guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 77, 24 de abr. 2006.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº N° 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 98, 22 de mai. 2012.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, v.1, p. 41, 2010.

BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B.; CHABNER, B. **Goodman & Gilman's**: As bases farmacológicas da terapêutica. 13 ed. Porto Alegre: AMGH, 2018.

BURUGULA, L.; MULLANGI, R.; PILLI, N. R.; MAKULA, A.; LODAGALA, D. S.; KANDHAGATLA, R. Simultaneous determination of sitagliptin and simvastatin in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**. v. 27, p. 80-87. 2013.

CASS, Q. B; DUGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC**: fundamentos, estratégias e validação. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas e matrizes biológicas. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 1021-1030. 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

DOGGRELL, S. A.; DIMMITT, S. B. Sitagliptin and other 'gliptins'– why prescribe them? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 17, p. 2-7, fev. 2016.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 471-481, 2003.

DUBALA, A.; KHATWAL, R.; KOSARAJU, J.; MEDA, V.; SAMANTA, M. K. Bioanalytical method development and validation of sitagliptin phosphate by RP-HPLC and its application to pharmacokinetic study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**. v. 4, n. 2, p. 691-694. 2012.

DURVE, J. S.; NAIK, S. Matrix effect – a review. **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**. v. 3, n. 3, p. 652-660, maio-jun. 2014.

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

FACHI, M. M.; LEONART, L. P.; PONTES, F. L. D.; VILHENA, R. O.; CERQUEIRA, L. B.; PONTAROLO, R. Bioanalytical methods for the detection of antidiabetic drugs: a review. **Bioanalysis**. v. 9, n. 24, dez. 2017.

FDA. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. 2018.

FERREIRA, L. T.; SAVIOLLI, I. H.; VALENTI, V. E.; ABREU, L. C. Diabetes mellitus: hyperglycemia and its chronic complications. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, Santo André, v.36, n. 3, p. 182-188, set-dez. 2011.

FRÁGUAS, R.; SOARES, S. M. S. R.; BRONSTEIN, M. D. Depression and diabetes mellitus. **Archives of Clinical Psychiatry**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 93-99. 2009.

GREEN, J. B.; BETHEL, M. A.; ARMSTRONG, P. W.; BUSE, J. B.; ENGEL, S. S.; GARG, J.; JOSSE, R.; KAUFMAN, K. D.; KOGLIN, J.; KORN, S.; LACHIN, J. M.; MCGUIRE, D. K.; PENCINA, M. J.; STANDL, E.; STEIN, P. P.; SURYAWANSHI, S.; WERF, F. V. D.; PETERSON, E. D.; HOLMAN, R. R. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *The New England journal of Medicine*. V. 373, p. 232-242, jul. 2015.

GUPTA, V.; KALRA, S. Choosing a gliptin. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, Mumbai, v. 15, n. 4, p. 298-308, out-dez. 2011.



HAAG, A. M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. **Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 919, p. 157-169. 2016.

HALIMI, S. Do not forget that type 2 diabetes does not only expose to cardiovascular complications. **Diabetes & Metabolism**. V40, p. 167-168, abr. 2014.

HE, L.; WICKREMASINGHA, P.; LEE, J.; TAO, B.; MENDELL-HARARY, J.; WALKER, J.; WIGHT, D. Lack of effect of colesevelam HCl on the single-dose pharmacokinetics of aspirin, atenolol, enalapril, phenytoin, rosiglitazone, and sitagliptin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 104, p. 401–409. 2014.

HERMAN, G. A.; BERGMAN, A. J.; LIU, F.; STEVENS, C.; WANG, A. Q.; ZENG, W.; CHEN, L.; SNYDER, K.; HILLIARD, D.; TANEN, M.; TANAKA, W.; MEEHAN, A. G.; LASSETER, K.; DILZER, S.; BLUM, R.; WAGNER, J. A. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the oral dpp-4 inhibitor sitagliptin in middle-aged obese subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, p. 876-886. 2006.

HERMAN, G. A.; MISTRY, G. C.; YI, B.; BERGMAN, A. J.; WANG, A. Q.; ZENG, W.; CHEN, L.; SNYDER, K.; RUCKLE, J. L.; LARSON, P. J.; DAVIES, M. J.; LANGDON, R.B.; GOTTESDIENER, K. M.; WAGNER, J. A. Evaluation of pharmacokinetic parameters and dipeptidyl peptidase-4 inhibition following single doses of sitagliptin in healthy, Young Japanese males. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 429–436. 2011.

HERMAN, G. A.; STEVENS, C.; DYCK, K. V.; BERGMAN, A. J.; YI, B.; SMET, M.; SNYDER, K.; HILLIARD, D.; TANEN, M.; TANAKA, W.; PHD, WANG, A. Q.; ZENG, W.; MUSSON, D.; WINCHELL, G.; DAVIES, M. J.; RAMAEL, S.; GOTTESDIENER, K. M.; WAGNER, J. A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebocontrolled studies with single oral doses. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 78, n. 6, p. 675-88, dec. 2005.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; POZO, O. J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. **Anal Bioanal Chem**. V.382, p. 934-946. 2005.

HIRANI, J. J.; RATHOD, D. A.; VADALIA, K. R. Orally Disintegrating Tablets: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 2, p. 161-172, abr. 2009.

HOLMAN, R. R.; SOURIJI, H.; CALIFF, R. M. Cardiovascular outcome trials of glucose-lowering drugs or strategies in type 2 diabetes. **The Lancet**. v. 383, p. 2008-2017, jun. 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Worldwide table 2019. [www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org), 2019.

INZUCCHI, S. E.; BERGENSTAL, R. M.; BUSE, J. B.; DIAMANT, M.; FERRANNINI, E.; NAUCK, M.; PETERS, A. L.; TSAPAS, A.; WENDER, R.; MATTHEWS, D. R.

Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes A Patient-Centered Approach. **Diabetes care**, v. 35, p. 1364-1375, 2012.

IQBAL, Q.; BASHIR, S.; JAN, S. U.; MALIK, M. Z.; AFZAL, I.; KHALID, A. Development of a rapid resolution HPLC method for the quantitative determination of sitagliptin in human plasma. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 31, n. 3, p. 795-799, mai, 2018.

JONAS, D.; SCOYOC, E. V.; GERRALD, K.; WINES, R.; AMICK, H.; TRIPLETTE, M.; RUNGE, T. Drug Class Review: newer diabetes medications, TZDs, and combinations. **Oregon Health & Science University**, Portland. 2011.

KIM, B. H.; KIM, S. E.; KANG, D.; LIM, K. S.; KIM, J. R.; JANG, I. J.; SHIN, S. G.; YOON, S. H.; CHO, J. Y.; YU, K. S. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling of Biomarker Response to Sitagliptin in Healthy Volunteers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, p. 113–125. 2013.

LA ROCA, M. F.; SOARES SOBRINHO, J. L.; NUNES, L. C. C.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.** v. 88, n. 4, p. 177-180. 2007.

LÁBORATÓRIOS MERK SHRP & DOHME (MSD). Bula média Januvia® (fosfato de sitagliptina). Campinas, jun. 2014.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LIM, C. K.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 546-557, 2002.

LIU, D. Q.; ARISON, B. H.; STEARNS, R. A.; KIM, D.; VINCENT, S. H. Short Communication Characterization of Two Cyclic Metabolites of Sitagliptin. **Drug Metabolism and Disposition**. v.35, p. 521-524. 2007.

LOOS, G.; SCHEPDAEL, A. V.; COBOOTER, D. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. **Philosophical transactions of the royal society a**. v.374, p. 1-25, out. 2016.

LOTFY, H. M.; MOHAMED, D.; MOWAKA, S. A comparative study of smart spectrophotometric methods for simultaneous determination of sitagliptin phosphate and metformina hydrochloride in their binary mixture. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 149, p. 441-451, 2015.

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

MOGOLLÓN, N. G. A.; LIMA, P. F.; GAMA, M. R.; FURLAN, M. F.; BRAGA, S. C. G. N.; PRATA, P. S.; JARDIM, I. C. S. F.; AUGUSTO, F. O estado da arte da cromatografia líquida bidimensional: conceitos fundamentais, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 10, p. 1680-1691, set. 2014.

NIROGI, R.; KANDIKERE, V.; MUDIGONDA, K.; KOMARNENI, P.; ALETI, R.; BOGGAVARAPU, R. Sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, in human plasma using liquid-liquid extraction. **Biomed. Chromatogr.** v. 22, p. 214-222. 2008.

PATEL, P. N.; SAMANTHULA, G.; SRIDHAR, V.; ARLA, R.; VARANASI, K. K. V. S.; KUMAR, S. V. V. S. Validated LC-MS/MS method for simultaneous determination of Dasatinib and Sitagliptin in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. **Royal Society of Chemistry.** v. 6, p. 433-439. 2014.

PINHAS-HAMIEL, O.; ZEITLER, P. Acute and chronic complications of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **The Lancet**, v. 369, p. 1823-1831, mai. 2007.  
POMILIO, A. B.; BERNATENÉ, E. A.; VITALE, A. A. Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 45, n. 1, p. 47-79. 2011.

RAMOS, L.; FERREIRA, E. A. P. Emotional factors, life quality and adhesion of treatment in adult with type 2 diabetes. **Journal of Human Growth and Development**, v. 21, n. 3, p. 867-877. 2011.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REDDY, S.; AHMED, I.; AHMAD, I.; MUKHOPADHYAY, A.; THANGAM, S. Development and Validation of a Method for Simultaneous Estimation of Metformin and Sitagliptin in Human Plasma by LC-MS-MS and Its Application in a Bioequivalence Study. **Journal of Chromatographic Science.** v. 53, p. 1549-1556. 2015.

SANGLE, G. V.; PATIL, M.; DESHMUKH, N. J.; SHENGULE, S. A.; KAMBLE, S.; VUPPALAVANCHU, K. K.; KALE, S.; BAIG, M. L. A.; SINGH, G.; SHAIKH, J.; TRIPATHI, J.; ARAVINDABABU, P. Evaluation of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters following single dose of sitagliptin in healthy Indian males. **European Journal of Clinical Pharmacology.** V.74, p. 561-569, mar. 2018.

SCHEEN, A. J. Antidiabétiques oraux dans le traitement du diabète de type 2: perspectives historique et médico-économique **Médecine des maladies Métaboliques**, v. 9, n. 2, p. 186-197, mai. 2015.

SCHEEN, A. J.; CHARBONNEL, B. Effects of glucose-lowering agents on vascular outcomes in type 2 diabetes: A critical reappraisal. **Diabetes & Metabolism.** v. 40, p. 176-185, abr. 2014.

SHAKYA, S. Formulation and Optimization of Immediate Release Tablet of Sitagliptin Phosphate using Response Surface Methodology. **International Journal of Pharmacy, Biology and Medical Sciences.** V.4, p. 7-12, jan-dez. 2015.

SIRIGIRI, N.; SUBRAMANIAN, N. S.; REDDY, G. N. K. Stability Indicating Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Sitagliptin Phosphate and

Metformin HCL in tablets by HPLC. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 9, p. 4294-4302, out. 2018.

SMULDERS, R. A.; ZHANG, W.; VELTKAMP, S. A.; VAN DIJK, J.; KRAUWINKEL, W. J. J.; KEIRNS, J.; KADOKURA, T. No pharmacokinetic interaction between ipragliflozin and sitagliptin, pioglitazone, or glimepiride in healthy subjects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 14, p. 937–943, out. 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo. 2017.

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

STOFELLA, N. C. F. **Caracterização no estado sólido da sitagliptina e desenvolvimento tecnológico de comprimidos orodispersível**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2018.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDINS, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAR-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623. 2002.

TRINDADE-SUEDAM, I. K.; KOSTRISCH, L. M. V.; PIMENTA, L. A. F.; NEGRATO, C. A.; FRANZOLIN, S. B.; TRINDADE JUNIOR, A. S. Diabetes mellitus e uso de drogas durante a gravidez e o risco de fissuras orofaciais e anomalias relacionadas. **Rev. Latino- Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 24, ago. 2016.

VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. **A regulação de Medicamentos no Brasil**. 2013.

VOGESER, M.; SEGER, C. LC-MS/MS in clinical chemistry. **Journal of Chromatography B**. v. 883-884, p. 1-2, fev. 2012.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**. V.11, p. 49-79, abr. 2009.

ZENG, W.; MUSSON, D. G.; FISHER, A. L.; WANG, A. Q. Determination of MK-0431 in human plasma using high turbulence liquid chromatography online extraction and tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**. v. 20, p. 1169–1175. 2006.

ZERILLI, T.; PYON, E. Y. Sitagliptin phosphate: A DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 12, p. 2614-2634, dez. 2007.



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -  
SCS/UFPR



## ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo de biodisponibilidade e farmacocinética de comprimidos orodispersíveis contendo sitagliptina

**Pesquisador:** FABIO SEIGI MURAKAMI

#### Área Temática:

**Versão:** 5

**CAAE:** 09925519.1.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Patrocinador Principal:** FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.765.601

#### Apresentação do Projeto:

**Título do Projeto:** Estudo de biodisponibilidade de comprimidos orodispersíveis contendo sitagliptina.

**Pesquisador Principal:** Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami

**Colaboradores:** Elisa de Freitas Montin e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Martins Guimarães de Francisco

**Local de Realização:** Universidade Federal do Paraná (UFPR). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Av. Prefeito Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico.

**Período da Pesquisa:** Março de 2019 a março de 2020.

Esse estudo visa desenvolver e validar um método analítico rápido, simples e sensível utilizando o cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado à espectrometria de massas sequencial (EM/EM), para a quantificação da sitagliptina, possibilitando o estudo de biodisponibilidade e o perfil farmacocinético de comprimidos orodispersíveis de sitagliptina, utilizando sangue e urina de voluntários.

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -  
SCS/UFPR



Hipótese

Se o método desenvolvido é capaz de quantificar com segurança, em plasma e urina humanos, a

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br)



Continuação do Parecer: 3.765.601

sitagliptina; Comparar o perfil farmacocinético do comprimido orodispersível frente ao perfil de um comprimido tradicional, através da metodologia desenvolvida.

#### Metodologia

Com o método de HPLC - MS/MS já otimizado e validado, será aplicado em amostras de plasma humano para a quantificação da sitagliptina. Após aprovação do CEP, os voluntários que cumprirem os critérios de inclusão serão convidados a participar, se estiverem de acordo receberão o TCLE. Somente depois da assinatura do termo é que o procedimento de administração do comprimido e coleta de sangue será realizado

#### Plano para recrutamento dos participantes:

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, será realizada busca ativa dos voluntários, priorizando estudantes e servidores da UFPR – Campus Jardim Botânico. Serão convidados a participar aqueles que atenderem aos requisitos do item 14.

O convite será realizado através do envio de email (ANEXO 3) aos alunos, professores e servidores vinculados ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR. Caso o número mínimo de participantes não seja atendido, estenderemos o convite a alunos, professores e servidores de outros programas de pós-graduação da UFPR. Os voluntários que desejarem participar deverão responder o email e entraremos em contato para confirmar a sua data de participação.

#### Critério de Inclusão:

Para ser incluído no estudo, o indivíduo deve ter idade igual ou superior a 18 anos, pesar mais de 50kg, não apresentar doenças crônicas, câncer, doenças metabólicas (como diabetes) ou alergia a qualquer componente da formulação.

#### Critério de Exclusão:

Caso o indivíduo não cumpra qualquer um dos seguintes requisitos: idade igual ou superior a 18 anos, pesar mais de 50kg, não apresentar doenças crônicas, câncer, doenças metabólicas (como diabetes) ou alergia a qualquer componente da formulação.

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.765.601

## Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

- Desenvolver e validar um método analítico rápido, simples e sensível utilizando o cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE) acoplado à espectrometria de massas sequencial (EM/EM), para a quantificação da sitagliptina, possibilitando o estudo de biodisponibilidade e o perfil farmacocinético de comprimidos oro dispersíveis de sitagliptina, utilizando sangue e urina de voluntários.

Objetivos específicos:

- Desenvolver um método para a quantificação da sitagliptina em plasma e urina humanos, através da CLAE EM/EM;
- Otimizar os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas;
- Validar o método desenvolvido para amostras de plasma humano atendendo as normas vigentes pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e normas internacionais, como a da FDA (Food and Drug Administration);
- Administrar uma dose de sitagliptina orodispersível, desenvolvidos pelo Grupo de Pesquisa em Controle de Qualidade e Tecnologia Farmacêutica (QUALITEC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR);
- Obter as amostras de plasma e urina de voluntários;
- Aplicar o método desenvolvido por CLUE-EM/EM em amostras de plasma e urina humanos;
- Quantificar a concentração de sitagliptina, nas amostras, através de CLAE-EM/EM;
- Determinar o perfil farmacocinético de acordo com as metodologias estatísticas necessárias;
- Realizar um estudo comparativo entre as farmacocinéticas de comprimidos tradicionais e orodispersíveis de sitagliptina.

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os autores com relação aos riscos:

Em razão de um estudo invasivo, é possível que os participantes sintam dor ou desconforto em relação a coleta das amostras de sangue.

Benefícios:

Com o desenvolvimento de um método de bioquantificação da sitagliptina, será possível realizar o estudo do perfil farmacocinético da forma farmacêutica orodispersível, contribuindo para o avanço das tecnologias em medicamentos. Tendo o comprimido um perfil farmacocinético semelhante ao

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br





Continuação do Parecer: 3.765.601

perfil do comprimido tradicional, pode ser sugerido a troca da forma farmacêutica, facilitando o manuseio e a adesão dos pacientes, com DM, ao tratamento.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não há.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos foram apresentados.

### **Recomendações:**

Não há.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências do parecer anterior foram atendidas, portanto o projeto já pode ser iniciado.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

\*Em caso de projetos com Coparticipantes que possuam Comitês de Ética, seu TCLE somente será liberado após aprovação destas instituições.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br), necessário informar o CAAE.

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: [www.cometica.ufpr.br](http://www.cometica.ufpr.br) (obrigatório envio)

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br)



Continuação do Parecer: 3.765.601

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1307202.pdf	21/11/2019 10:28:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado4.docx	21/11/2019 10:28:00	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Pendencias_e_Inadequacoes4.docx	21/11/2019 10:27:49	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Cronograma	Cronograma2.docx	21/11/2019 10:27:38	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP_revisado3.docx	21/11/2019 10:26:27	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Anuencia_medica2.pdf	09/09/2019 21:02:54	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado3.docx	09/09/2019 21:01:17	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP_revisado2.docx	09/09/2019 21:00:53	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Ficha_Clinica.docx	09/09/2019 21:00:39	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Pendencias_e_Inadequacoes3.docx	09/09/2019 20:59:35	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Anuencia_medica.pdf	11/07/2019 14:48:17	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Pendencias_e_Inadequacoes2.docx	11/07/2019 14:47:51	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado2.docx	11/07/2019 14:46:47	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP_revisado1.docx	22/05/2019 10:22:37	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado1.docx	22/05/2019 10:22:24	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Pendencias_e_Inadequacoes.docx	20/05/2019 17:00:05	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Compromissos_da_equipe_modelo6.	19/03/2019	ELISA DE FREITAS	Aceito

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -  
SCS/UFPR



Outros	pdf	15:49:48	MONTIN	Aceito
Outros	Check_list_documental.pdf	19/03/2019 15:49:16	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	19/03/2019 15:36:02	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Ata_de_aprovacao.pdf	19/03/2019 15:35:37	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	19/03/2019 15:11:08	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Parecer_tecnico.pdf	19/03/2019 15:02:58	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP.docx	19/03/2019 15:01:46	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/03/2019 14:58:57	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Guarda_de_material_biologico_modelo7 .pdf	19/03/2019 14:58:32	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Servico_envolvido_LEAC_modelo3.pdf	19/03/2019 14:56:18	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Servico_envolvido_CEB_modelo3.pdf	19/03/2019 14:55:54	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Outros	Analise_do_merito_modelo2.pdf	19/03/2019 14:53:06	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Oficio_do_pesquisador_modelo1.pdf	19/03/2019 14:51:43	ELISA DE FREITAS MONTIN	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 12 de  
Dezembro de 2019

**Assinado por:**

**IDA CRISTINA GUBERT**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br